



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TARSILA FERRAZ FREZZA

“Ação de *Cordia verbenacea* sobre *Schistosoma mansoni*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)

TARSILA FERRAZ FREZZA

Silmara Marques Allegretti

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vera Lúcia Garcia Rehder

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

F899a Frezza, Tarsila Ferraz, 1983-
Ação de *Cordia verbenacea* sobre *Schistosoma mansoni* / Tarsila Ferraz Frezza. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Silmara Marques Allegretti.
Coorientador: Vera Lúcia Garcia Rehder.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Cordia verbenacea*. 2. *Schistosoma mansoni*.
3. Coleção *In vitro/In vivo*. 4. Fracionamento. 5.
Plantas medicinais. I. Allegretti, Silmara Marques,
1963-. II. Rehder, Vera Lúcia Garcia. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Activity of *Cordia verbenacea* on *Schistosoma mansoni*

Palavras-chave em Inglês:

Cordia verbenacea

Schistosoma mansoni

Collection *In vitro/In vivo*

Fractionation

Medicinal plants

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutor em Parasitologia

Banca examinadora:

Silmara Marques Allegretti [Orientador]

Mara Cristina Pinto

Luiz Augusto Magalhães

Marili Villa Nova Rodrigues

Alexandra Ivo de Medeiros

Data da defesa: 17-01-2012

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

Campinas, 17 de janeiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

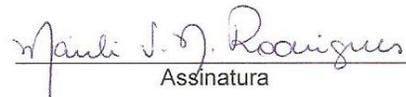
Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti
(Orientador(a))


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Mara Cristina Pinto


Assinatura

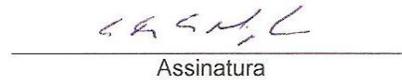
Prof(a). Dr(a). Marili Villa Nova Rodrigues


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Alexandra Ivo de Medeiro


Assinatura

Prof. Dr . Luiz Augusto Magalhães


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Carmen Lúcia Queiroga

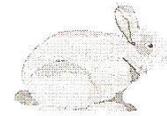
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Maria Palmira Daflon Gremião

Assinatura



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1899-1, sobre "Avaliação do efeito do óleo essencial e das frações aquosa e orgânica de *Cordia verbanacea* e dos extratos hidroalcoólico e diclorometânico de *Baccharis trimera* sobre *Schistosoma mansoni*", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Tarsila Ferraz Frezza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 17 de julho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1899-1, entitled "Evaluation of the effect of essential oil, aqueous and organic fractions of *Cordia verbanacea*, and effect of dichloromethane and hydroalcoholic extracts of *Baccharis trimera* on *Schistosoma mansoni*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on july 17, 2009.

Campinas, 17 de julho de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Dedico:

Aos meus pais, Lurdes e Santino, meus verdadeiros heróis, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho. Sou eternamente grata à vocês. Por tudo. Sempre!

Ao meu irmão Tales por todo apoio incondicional. Muito obrigada!

À minha filha Elis, minha principal motivação.

À todos aqueles que sofrem com as mais diversas moléstias negligenciadas pelas autoridades públicas. Ainda há aqueles que, em seus trabalhos de “formiguinhas”, pensam em vocês.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti por sua orientação e total apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos e sua sabedoria comigo! Obrigada por sua compreensão! Obrigada por sua amizade! Obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder, por sua co-orientação e pelas tão importantes considerações e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa dessa tese, por suas importantes sugestões que me ajudaram a aprimorar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Govone pelas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Parasitologia, por todo esforço empenhado na formação dos alunos deste local, a quem se dedicam intensamente.

À João Baptista Alves de Oliveira e Letícia Aparecida Duarte Bastos, pelo imenso apoio técnico e amizade.

À Adriana Silva Santos de Oliveira, pelo essencial auxílio na obtenção das amostras de *C. verbenacea*.

À Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira e Rosimeire Nunes de Oliveira pelo auxílio nos testes *in vitro* e microscopia eletrônica de varredura.

À Cesar Estevo pela amizade e auxílio nos cortes histológicos.

À Adriane Cristina Sarti Sprogis e Antônia Maria Ferreira Lima, técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela paciência e boa vontade com que me ensinaram as técnicas sobre microscopia eletrônica de varredura.

Às amigas e amigos do Departamento de Parasitologia, em especial do Laboratório de Helminologia, Maria Isabel Müller, Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira, Rosimeire Nunes de Oliveira, Luciana Franceschi Simões, Maria Francisca Neves, Letícia Aparecida Duarte Bastos, Júlia Pererira Molina, Michelle Viviane Sá dos Santos Rondon, Ana Karoline Teodoro, Eliana Anunciato

Franco, Camargo, Rubens Riscala Madi, Lincoln Lima Corrêa e João Baptista Alves de Oliveira, por todos os bons momentos que vivemos juntos e que levarei comigo para sempre.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ninguém é tão rico que não possa receber, nem tão pobre que não possa doar (Leonardo Boff).

Ninguém é tão sábio que não possa aprender, nem tão ignorante que não possa ensinar.

Sumário

Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Pranchas.....	xvii
Lista de Tabela.....	xviii
Abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxii
Abstract.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1 Aspectos gerais da esquistossomose.....	31
2.2 Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> e patologia.....	35
2.3 Medidas de controle para a esquistossomose mansônica.....	38
2.4 A quimioterapia da esquistossomose mansônica.....	39
2.5 Desenvolvimento de tolerância e resistência aos fármacos esquistossomicidas e a busca por novas alternativas.....	50
2.6 As plantas medicinais.....	53
2.7 <i>Cordia verbenacea</i>.....	57
2.8 Bioensaios.....	60
3. Objetivos.....	62
3.1 Objetivo geral.....	63
3.2 Objetivos específicos.....	63
4. Material e Métodos.....	64
4.1 Material Vegetal.....	65
4.2 Fitoquímica.....	65
4.2.1 Obtenção do óleo essencial (OE) de <i>C. verbenacea</i>	65

4.2.2	Obtenção do extrato etanólico (EE) e fração aquosa (FAEE) e orgânica (FOEE).....	65
4.2.3	Fracionamento da FOEE em coluna seca.....	65
4.2.4	Fracionamento da F3 em coluna seca.....	66
4.3	Métodos analíticos.....	66
4.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	66
4.4	Solubilização das amostras.....	66
4.5	Estudos de atividade biológica.....	67
4.5.1	Obtenção da linhagem de <i>S. mansoni</i>	67
4.5.2	Animais hospedeiros.....	67
4.5.3	Manutenção do ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	68
4.6	Ensaio <i>in vitro</i>.....	69
4.6.1	Obtenção dos vermes adultos.....	69
4.6.2	Grupos experimentais.....	69
4.6.3	Avaliação dos grupos experimentais.....	71
4.6.4	Cálculo das DLs 50 e 90.....	73
4.7	Ensaio <i>in vivo</i>.....	74
4.7.1	Tratamentos dos camundongos.....	74
4.7.2	Análise do tratamento.....	75
4.7.3	Observações histológicas.....	76
4.8	Microscopia eletrônica de varredura.....	77
4.9	Comitê de Ética.....	77
4.10	Análises gráficas e estatísticas.....	78
5.	Resultados.....	79
5.1	Estudos fitoquímicos.....	80

5.2 Ensaio <i>in vitro</i>.....	86
5.2.1 Sobrevida de adultos de <i>S. mansoni</i> em presença de OE, FAEE, FOEE, refracionamento e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i>	86
5.2.2 Efeito de OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , na atividade motora e acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	93
5.2.3 Efeito de OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , sobre alterações tegumentares, musculares e em órgãos internos sobre adultos de <i>S. mansoni</i>	107
5.2.4 Efeito de OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , sobre a oviposição das fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i>	120
5.2.5 Cálculo das DLs 50 e 90.....	126
5.2.6 Amostras de maior atividade.....	127
5.3 Ensaio <i>in vivo</i>.....	129
5.3.1 Ação das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	129
5.3.2 Ação das FOEE e F3 sobre a oviposição de <i>S. mansoni</i>	136
5.3.2.1 Ação das FOEE e F3 sobre OPG e oograma.....	136
5.3.2.2 Ação das FOEE e F3 nas reações granulomatosas provocadas pelos ovos de <i>S. mansoni</i>	145
5.3.3 Relação entre a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, OPG e quantidade de granulomas hepáticos..	152
5.3.4 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal e hepatoesplenomegalia.....	156

5.3.5	Ação das FOEE e F3 sobre o tegumento de adultos de <i>S. mansoni</i> após ensaios <i>in vivo</i>	162
6.	Discussão	170
6.1	Estudos fitoquímicos	171
6.2	Ensaio <i>in vitro</i>	173
6.2.1	Sobrevida de adultos de <i>S. mansoni</i> em presença de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i>	173
6.2.2	Efeito de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , na atividade motora e acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	176
6.2.3	Efeito de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , sobre alterações tegumentares, musculares e em órgãos internos sobre adultos de <i>S. mansoni</i>	180
6.2.4	Efeito de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de <i>C. verbenacea</i> , sobre oviposição das fêmeas de <i>S. mansoni</i>	184
6.2.5	DLs 50 e 90.....	187
6.3	Ensaio <i>in vivo</i>	188
6.3.1	Ação das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	189
6.3.2	Ação das FOEE e F3 sobre a oviposição de <i>S. mansoni</i>	194
6.3.2.1	Ação das FOEE e F3 sobre OPG e oograma.....	194
6.3.2.2	Ação das FOEE e F3 nas reações granulomatosas provocadas pelos ovos de <i>S. mansoni</i>	200

6.3.3 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal e hepatoesplenomegalia.....	202
6.3.4 Ação das FOEE e F3 sobre o tegumento de adultos de <i>S. mansoni</i> após ensaios <i>in vivo</i>	204
7. Conclusões.....	206
7.1 Ensaios <i>in vitro</i>	207
7.2 Ensaios <i>in vivo</i>	207
8. Referências.....	209

Lista de Figuras

Figura 1 Distribuição mundial da esquistossomose mansônica.....	33
Figura 2 Distribuição da esquistossomose mansônica nos estados brasileiros....	34
Figura 3 Ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	37
Figura 4 Oxaminiquina: estrutura química.....	42
Figura 5 Praziquantel: estrutura química.....	43
Figura 6 <i>C. verbenacea</i>	58
Figura 7 Esquema experimental dos ensaios <i>in vitro</i>	71
Figura 8 Alterações em órgãos internos exibida pela fêmea adulta de <i>S. mansoni</i> durante teste <i>in vitro</i>	73
Figura 9 Esquema experimental de tratamento dos camundongos Balb/c.....	75
Figura 10 Obtenção e rendimento (mg) das amostras de <i>C. verbenacea</i>	81
Figura 11 CCD do EE e das FOEE e FAEE.....	82
Figura 12 CCD da FOEE e das frações da coluna seca: F1-2, F3 e F4-5.....	83
Figura 13 CCD das F3, F3.5, F3.6 e F3.7-3.9.....	84
Figura 14 CCD da artemetina isolada e da FOEE.....	85
Figura 15 Ação de OE, FAEE, FOEE, refração e artemetina extraídos de <i>C. verbenacea</i> sobre mortalidade de adultos de <i>S. mansoni</i> , machos e fêmeas, em relação ao período de observação.....	89
Figura 16 Ação das F1-2, F3 e F4-5, obtidas do fracionamento da FOEE de <i>C. verbenacea</i> , sobre mortalidade de adultos de <i>S. mansoni</i> , machos e fêmeas, em relação ao período de observação.....	90
Figura 17 Ações das F1-2, F3, F4-5 obtidas de refração da F3, sobre mortalidade de adultos de <i>S. mansoni</i> , machos e fêmeas, em relação ao período de observação.....	91

Figura 18 Ação de artemetina e do PZQ sobre sobre mortalidade de adultos de <i>S. mansoni</i> , machos e fêmeas, em relação ao período de observação.....	92
Figura 19 Ação do OE, FAEE e FOEE na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	122
Figura 20 Ação das F1-2, F3, F4-5 (obtidas de fracionamento da FOEE) na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	123
Figura 21 Ação das F3.5, F3.6 e F3.7-3.9 (obtidas do refracionamento da F3) na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	124
Figura 22 Ação da artemetina e do PZQ na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	125
Figura 23 Avaliação da ação esquistossomicida – <i>in vivo</i> – das FOEE e F3, comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg – não tratado) e com o PZQ.....	135
Figura 24 Avaliação da ação das FOEE e F3 - <i>in vivo</i> – sobre a oviposição de <i>S.mansoni</i> comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg – não tratado) e com o PZQ.....	141
Figura 25 Avaliação da ação das FOEE e F3 - <i>in vivo</i> – sobre a viabilidade dos ovos de <i>S.mansoni</i> comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg – não tratado) e com o PZQ. Tratamento realizado aos 45 dias de infecção.....	144
Figura 26 Avaliação da ação das FOEE e F3 - <i>in vivo</i> – sobre a viabilidade dos ovos de <i>S.mansoni</i> comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg – não tratado) e com o PZQ. Tratamento realizado aos 60 dias de infecção.....	144
Figura 27 Média de granulomas hepáticos, intestinais, esplênicos e pulmonares em tratamento realizado aos 45 dias de infecção.....	149
Figura 28 Média de granulomas hepáticos, intestinais, esplênicos e pulmonares em tratamento realizado aos 60 dias de infecção.....	150

Figura 29 Relação entre os tratamentos (efetuados aos 45 dias de infecção) e suas concentrações testadas, com a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, ovos por grama de fezes e granulomas hepáticos.....	153
Figura 30 Relação entre os tratamentos (efetuados aos 60 dias de infecção) e suas concentrações testadas, com a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, ovos por grama de fezes e granulomas hepáticos.....	155
Figura 31 Peso médio corporal do fígado e do baço de camundongos submetidos a diferentes tratamentos, aos 45 dias de infecção.....	161
Figura 32 Peso médio corporal do fígado e do baço de camundongos submetidos a diferentes tratamentos, aos 60 dias de infecção.....	161
Figura 33 Estrutura química da artemetina.....	171

Lista de Pranchas

Prancha 1 Granulomas hepáticos. Tratamentos realizados aos 45 dias de infecção com 200 mg/kg de PZQ, FOEE ou F3.....	151
Prancha 2 Grupo controle negativo (não recebeu tratamento).....	163
Prancha 3 Grupo controle negativo (não recebeu tratamento).....	164
Prancha 4 Ação da FOEE de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento dos machos adultos de <i>S. mansoni</i>	165
Prancha 5 Ação da F3 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento dos machos adultos de <i>S. mansoni</i>	166
Prancha 6 Ação da F3 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento de fêmea adulta de <i>S. mansoni</i>	167
Prancha 7 Ação do PZQ sobre o tegumento de adultos de <i>S. mansoni</i>	168
Prancha 8 Ação do PZQ de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento dos machos adultos de <i>S. mansoni</i>	169

Lista de Tabelas

Tabela 1 Fármacos e compostos com ação esquistossomicida já testados em humanos.....	50
Tabela 2 Extratos e compostos de plantas com comprovada ação anti- <i>S. mansoni</i>	55
Tabela 3 Atividade comprovada dos diferentes extratos e compostos isolados de <i>C. verbenacea</i>	60
Tabela 4 Distribuição dos grupos experimentais na placa de cultura (24 poços).....	70
Tabela 5 Porcentagem de vermes mortos no final do experimento com as amostras derivadas de <i>C. verbenacea</i>	87
Tabela 6 Amostras derivadas de <i>C. verbenacea</i> que apresentam ação esquistossomicida para 100% dos vermes em relação ao tempo.....	88
Tabela 7 Efeito do OE de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	95
Tabela 8 Efeito da FAEE de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	96
Tabela 9 Efeito da FOEE de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	97
Tabela 10 Efeito da F1-2 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	98
Tabela 11 Efeito da F3 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	99
Tabela 12 Efeito da F4-5 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	100
Tabela 13 Efeito da F3.5 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	101

Tabela 14 Efeito da F3.6 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	102
Tabela 15 Efeito da F3.7-3.9 de <i>C. verbenacea</i> sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	103
Tabela 16 Efeito da artemetina sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	104
Tabela 17 Efeito do PZQ sobre o acasalamento e atividade motora de aultos de <i>S. mansoni</i>	105
Tabela 18 Efeito do DMSO (0,05%) sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de <i>S. mansoni</i>	106
Tabela 19 Efeito do OE de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	108
Tabela 20 Efeito da FAEE de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	109
Tabela 21 Efeito do FOEE de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	110
Tabela 22 Efeito da F1-2 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	111
Tabela 23 Efeito da F3 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	112
Tabela 24 Efeito da F4-5 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	113
Tabela 25 Efeito da F3.5 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	114
Tabela 26 Efeito da F3.6 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	115

Tabela 27 Efeito da F3.7-3.9 de <i>C. verbenacea</i> sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	116
Tabela 28 Efeito da artemetina sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	117
Tabela 29 Efeito do PZQ sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	118
Tabela 30 Efeito do DMSO (0,05%) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de <i>S. mansoni</i>	119
Tabela 31 Ação das amostras de <i>C. verbenacea</i> na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	121
Tabela 32 DLs 50 e 90 das amostras testadas <i>in vitro</i>	126
Tabela 33 Atividade anti- <i>S. mansoni</i> das diferentes amostras testadas.....	127
Tabela 34 Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , em tratamento feito aos 45 dias de infecção.....	133
Tabela 35 Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , em tratamento feito aos 60 dias de infecção.....	134
Tabela 36 Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre a oviposição de <i>S. mansoni</i> - tratamentos realizados aos 45 dias de infecção.....	142
Tabela 37 Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre a oviposição de <i>S. mansoni</i> - tratamentos realizados aos 60 dias de infecção.....	143
Tabela 38 Ação das FOEE e F3 sobre o granuloma hepático.....	147
Tabela 39 Ação das FOEE e F3 sobre a quantidade de granulomas no intestino, baço e pulmão.....	148
Tabela 40 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal, do fígado e baço dos camundongos em tratamento feito aos 45 dias de infecção.....	159
Tabela 41 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal, do fígado e baço dos camundongos em tratamento feito aos 60 dias de infecção.....	160

Abreviaturas

BH – Belo Horizonte

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia Gasosa – Espectometria de Massas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

FAEE – Fração Aquosa Extrato Etanólico

FOEE – Fração Orgânica Extrato Etanólico

F1-2 – Frações 1 à 2 obtida do refração da fração orgânica

F3 – Fração 3 obtida do refração da fração orgânica

F4-5 – Fração 4 à 5 obtida do refração da fração orgânica

F3.5 – Fração 3.5 obtida do refração da fração 3

F3.6 – Fração 3.6 obtida do refração da fração 3

F3.7-3.9 – Fração 3.7 à 3.9 obtida do refração da fração 3

OE – Óleo Essencial

OPG – Ovos por grama de fezes

PBS - Phosphate Buffered Saline

PZQ – Praziquantel

RRS – Razão Relativa ao Sexo

WHO – World Health Organization

RESUMO

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

A esquistossomose mansônica, doença parasitária debilitante causada pela espécie de trematódeo *Schistosoma mansoni* mata cerca de 280.000 pessoas ao ano. Atualmente, os fármacos empregados para tratamento (praziquantel - PZQ - e oxaminiquina) apresentam casos de tolerância e resistência, sendo necessária a criação de novos medicamentos. Nesse contexto, pesquisas com plantas medicinais consistem numa alternativa viável. Este trabalho se destinou a avaliar a ação de *Cordia verbenacea* sobre *S. mansoni*, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* foram realizados com 4 concentrações (50, 100, 200 e 400 µg/mL) de óleo essencial (OE), fração aquosa (FAEE) e fração orgânica (FOEE), obtidas das partes aéreas da planta, com refrações da FOEE e com o composto artemetina. A FOEE apresentou maior atividade esquistossomicida com as concentrações mais altas e foi refraída. Do seu refraimento, a fração 3 (F3) foi a que apresentou maior mortalidade. Ambas foram escolhidas para os testes *in vivo* nos quais camundongos Balb/c, infectados 45 ou 60 dias antes, receberam concentrações diferentes das frações (40, 100, 200 ou 300 mg/kg), em dose única por via oral. A avaliação da atividade das frações foi feita com base nos seguintes parâmetros: ação sobre os vermes adultos, ovos eliminados ao ambiente, oograma, formação das reações granulomatosas, hepatoesplenomegalia e ação sobre o tegumento dos vermes recuperados nos testes *in vivo* por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Obteve-se redução de vermes de até 31% com a FOEE, na concentração de 40 mg/kg, administrada 45 dias após a infecção (o PZQ não apresentou redução nessa concentração); redução de ovos por grama de fezes de até 85,1% para 200 mg/kg de FOEE, administrada no 60º dia, enquanto o PZQ apresentou 20,5%; grande quantidade de ovos mortos no oograma para a F3, a partir de 100 mg/kg, seguindo o mesmo padrão apresentado pelo PZQ, 300 mg/kg; menor quantidade de granulomas por

fígado analisado (média de 3,0 granulomas por órgão) para a FOEE, 300 mg/kg, administrada aos 45 dias de infecção, sendo que o PZQ, nesse mesmo esquema de tratamento, apresentou 9,6 granulomas em média; diminuição da hepatomegalia com 200 mg/kg de ambas as frações, no 60º dia de infecção. Imagens obtidas pela MEV mostraram extensas alterações no tegumento dos vermes machos submetidos a ambas as frações, sendo essas maiores que as provocadas pelo PZQ. Esses resultados indicam que *C. verbenacea* apresenta atividade tanto contra *S. mansoni* quanto contra a patologia provocada por esse helminto. Tais resultados foram por vezes superiores aos do PZQ, que se trata de uma substância pura. Os dados obtidos em relação à diminuição da patologia pode ter sido uma consequência das propriedades anti-inflamatória que a espécie possui.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea*. *Schistosoma mansoni*. *In vitro/In vivo*. Fracionamento. Plantas Mediciniais.

ABSTRACT

FREZZA, T. F. **Activity of *Cordia verbenacea* on *Schistosoma mansoni***. 2012. Thesis (Doctorate in Parasitology) – Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

The trematode *Schistosoma mansoni* is responsible for causing a form of schistosomiasis that kills around 280,000 people each year. Since there are cases of tolerance and resistance to the drugs currently used in the treatment for this disease, namely praziquantel (PZQ) and oxamniquine, there is a need for new schistosomicidal drugs. In that regard, the research with medicinal plants is a viable alternative. The purpose of this work was to evaluate the activity of *Cordia verbenacea* on *S. mansoni* by means of both *in vitro* and *in vivo* tests. The *in vitro* tests were performed using 4 concentrations (50, 100, 200, and 400 µg/mL) of essential oil (OE), aqueous fraction (FAEE) and organic fraction (FOEE), obtained from aerial parts of the plant; fractions of the organic fraction; and artemitin. The FOEE showed stronger schistosomicidal activity with the higher concentrations, and it was fractionated. Among the resulting fractions, fraction 3 (F3) yielded the highest mortality of worms. Therefore, both fractions were chosen for the *in vivo* tests, in which Balb/c mice, infected 45 or 60 days before, received different concentrations of the fractions (40, 100, 200, or 300 mg/kg), administered orally in a single dose. The activity of the fractions was evaluated based on the following parameters: activity on adult worms, eggs released in the environment, egg count, formation of granulomatous reactions, hepatosplenomegaly, and activity on the tegument of worms retrieved from the *in vivo* tests by scanning electron microscopy (SEM). Administered 45 days after the infection at 40 mg/kg, the FOEE provided a reduction of up to 31% of the worms (PZQ did not result in any reduction at that concentration); administered 60 days after the infection at 200 mg/kg, the FOEE provided a reduction of 85.1% of eggs per gram of faeces, whereas PZQ reached 20.5%; fraction 3, at 100 mg/kg, resulted in a large quantity of dead eggs in the egg count, the same happening for PZQ at 300 mg/kg; administered 45 days after the infection at 300 mg/kg, the FOEE resulted in less granulomas per liver (average of 3.0 granulomas per organ), whilst PZQ, under the

same treatment conditions, resulted in an average of 9.6 granulomas; on the 60th day of infection and at 200 mg/kg, both fractions caused a reduction of hepatomegaly. Images obtained by SEM showed large changes on the tegument of male worms subjected to both fractions, such changes being larger than those caused by PZQ. These results indicate that the plant *C. verbenacea* presents activity against both *S. mansoni* and the disease caused by this helminth. In some cases *C. verbenacea* provided better results than PZQ, which is a pure substance. The data related to the reduction of the pathology can be a consequence of the anti-inflammatory properties of the plant.

Keywords: *Cordia verbenacea*. *Schistosoma mansoni*. *In vitro/In vivo*. Fractionation. Medicinal Plants.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma enfermidade parasitária causada por trematódeos que habitam o interior de vasos sanguíneos e que pertencem ao gênero *Schistosoma*. As principais espécies que parasitam o homem são: *S. mansoni* (transmitida por planorbídeos do gênero *Biomphalaria*; causa a forma hepática e intestinal da doença; presente na África, Península Arábica e América do Sul); *S. haematobium* (cujo hospedeiro intermediário são moluscos do gênero *Bulinus*; provoca a esquistossomose urinária na África e Península Arábica) e *S. japonicum* (que apresenta como transmissor o molusco anfíbio *Oncomelania*; gera a esquistossomose hepática e intestinal, ocorre na China, Filipinas e Indonésia onde é considerada uma zoonose por acometer outros mamíferos como gado, cães, suínos e roedores) (GRYSEELS *et al.*, 2006).

Diferente da malária, tuberculose e AIDS a esquistossomose, assim como várias outras helmintíases, protozooses, doenças virais e bacterianas, permanece negligenciada (HOTEZ *et al.*, 2006, 2007; UTZINGER *et al.*, 2009; UTZINGER *et al.*, 2011). De acordo com Utzinger *et al.* (2011) não existe nenhuma organização global de combate a esquistossomose como ocorre com as doenças citadas acima. Ainda segundo esses autores, a estreita ligação com a pobreza, isolamento geográfico de certas áreas acometidas, falta de "voz" política da população afetada e ausência de mecanismos de financiamento global ao combate da doença explicam a negligência dessa e de outras enfermidades (MOLYNEUX, 2008; WEISS, 2008; HOTEZ *et al.*, 2008; MORAN *et al.*, 2009; GRAY *et al.*, 2010; PAYNE & FITCHETT, 2010).

De acordo com Steinmann *et al.* (2006), a esquistossomose consiste na mais importante doença transmitida pela água. Isso faz com que seja uma doença típica da pobreza, devido à falta de acesso da população das áreas endêmicas à água limpa e saneamento básico (KING, 2010).

Acredita-se que atualmente existam cerca de 800 milhões de pessoas no mundo sob risco de infecção. Estima-se também que existam mais de 207 milhões de pessoas infectadas (STEINMANN *et al.*, 2006).

No Brasil, onde apenas a espécie *S. mansoni* está presente, cerca de 43 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e 7 milhões estão infectadas, sendo o país mais afetado por esse tipo de esquistossomose das Américas (LAMBERTUCCI, 2010; WHO, 2010).

Segundo Parise-Filho & Silveira (2001) a quimioterapia da esquistossomose mansônica pode estar num ponto crucial, já que poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento desta doença. Dessa forma, atualmente, a oxaminiquina e o praziquantel são os únicos fármacos empregados no tratamento da parasitose na África e nas Américas (FERRARI *et al.*, 2003).

A oxaminiquina, no entanto, possui efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos, carcinogênicos e baixa atividade nos casos de esquistossomose mansônica adulta (FRÉZARD & MELO, 1997). Dessa forma, a distribuição desse fármaco não é adequada, uma vez que a única indústria farmacêutica que a produz e comercializa mantém sua produção reduzida, legando ao praziquantel, praticamente, a única forma de tratamento (KUSEL & HAGAN, 1999). Este é bem tolerado por pacientes de todas as idades e com diferentes formas clínicas de esquistossomose, incluindo casos hepatoesplênicos avançados (FROHBERG, 1984; BASSILY *et al.*, 1985).

Entretanto, a oxaminiquina e o praziquantel apresentam casos de tolerância e resistência. Isso porque, o uso regular de medicamentos para controle de parasitoses possuem riscos de desenvolvimento de tolerância e resistência ao fármaco (LIANG *et al.*, 2001). Por essa razão é urgente a necessidade de melhoria dos fármacos já existentes ou a busca de novos compostos esquistossomicidas, presentes, por exemplo, em plantas medicinais.

Este trabalho se destinou, portanto, a avaliar a ação anti-*S. mansoni*, para a linhagem BH, do óleo essencial (OE), frações aquosa (FAEE) e orgânica (FOEE) de *C. verbenacea* e do composto isolado artemetina por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Também procurou avaliar a ação de refrações obtidos da amostra de maior atividade *in vitro* contra esse helminto.

A espécie *C. verbenacea* consiste em uma planta medicinal nativa do Brasil, popularmente conhecida por “erva-baleeira” ou “salicina”. Pertence à família Boraginaceae e é amplamente distribuída ao longo da costa brasileira, encontrada principalmente do litoral de São Paulo à Santa Catarina (DE-CARVALHO *et al.*, 2004). Foi escolhida para testar sua atividade esquistossomicida em virtude de suas propriedades anti-inflamatórias, considerando que a principal causa da morbidade da esquistossomose mansônica se deve às reações inflamatórias que ocorrem ao redor do ovos do parasito retido nos tecidos do hospedeiro (granuloma esquistossomótico) (GRYSEELS *et al.*, 2006). Além disso, ainda não foi relatado na literatura estudos com *C. verbenacea* no combate a esquistossomose mansônica.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose humana é uma doença parasitária debilitante provocada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, pertencentes à família Schistosomatidae.

Embora tenha sido descoberto apenas em 1851 por Theodore Bilharz, ao confirmar a presença do verme hoje conhecido como *S. haematobium* nos vasos mesentéricos de um camponês egípcio autopsiado, ovos de *Schistosoma* foram encontrados em múmias egípcias datadas de 3500 A.C., mostrando o quão é antiga essa doença. Theodore Bilharz assim denominou esse gênero uma vez que o macho apresenta uma fenda longitudinal em seu corpo (*schisto* = fenda, *soma* = corpo), conhecido como canal ginecóforo, onde a fêmea se aloja para que a fecundação ocorra (COURA & AMARAL, 2004).

Estima-se que existam mais de 207 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que dessas, 120 milhões possuem a forma sintomática da doença e 20 milhões a severa. Além disso, cerca de 800 milhões estão em áreas de risco de infecção e 500 mil morrem anualmente (CHITSULO *et al.*, 2000; PARISE-FILHO & SILVEIRA, 2001; ENGELS *et al.*, 2002; STEINMANN *et al.*, 2006; KING, 2009).

De acordo com a World Health Organization (WHO), acredita-se que a esquistossomose causa, anualmente, perdas entre 1 a 7 e 4 a 5 milhões de “Disability Adjusted Life Years” (soma dos anos potenciais de vida perdidos devido à prematura mortalidade e dos anos de vida produtivos perdidos devido à enfermidade). Por essa razão é considerada, dentre as doenças parasitárias negligenciadas, uma das mais prevalentes e importantes nos países em desenvolvimento (PARISE-FILHO & SILVEIRA, 2001; WHO, 2004; UTZINGER & KEISER, 2004)

Essa enfermidade ocorre em cerca de 76 países e territórios e está presente em regiões tropicais e subtropicais concentrando-se, principalmente, na África sub-saariana. Atinge geralmente crianças em idade escolar, adolescentes e adultos jovens o que gera um impacto negativo sobre o desempenho escolar além

da debilidade causada pelas infecções não tratadas minarem o desenvolvimento social e econômico nas áreas fortemente afetadas (TANNER, 1989; PARKER, 1992; WOOLHOUSE, 1998; CHITSULO *et al.*, 2000; STEINMANN, 2006).

As espécies de *Schistosoma* que infectam humanos são classificadas em responsáveis por provocar severos danos no fígado e/ou intestino (como *S. mansoni* - presente no meio oeste africano, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname - *S. japonicum* - China, Indonésia e Filipinas -, *S. mekongi* - Cambodja e Laos, *S. malayensis* - Malásia Peninsular -, *S. mattheei* - África do Sul, Zimbábue, Nigéria, Zaire, Botsuana, Moçambique e Zambia -, e *S. guineansis* - meio oeste e florestas tropicais africanas) e no trato urinário (como *S. hematobium* e *S. intercalatum* - ambas espécies são encontradas no meio oeste e florestas tropicais africanas). Espécies de *Schistosoma* sp. que ocorrem em mamíferos e aves podem infectar humanos, porém sem completar seu ciclo evolutivo, causando apenas dermatites devido a penetração da larva infectante na pele (WEBBE, 1981; CHANDIWANA *et al.*, 1987; WHO, 2011).

A esquistossomose mansônica, causada pela espécie *S. mansoni*, ocorre em 52 países e territórios, está presente principalmente na América do Sul, Caribe, África e Leste do Mediterrâneo onde constitui em um grave problema de ordem sócio-econômica e de saúde pública (Parise-Filho & Silveira, 2001). É conhecida popularmente por barriga d'água, xistosa, doença ou mal do caramujo e bilharziose. De acordo com King (2009), ocorre a morte de 280.000 pessoas infectadas por ano.

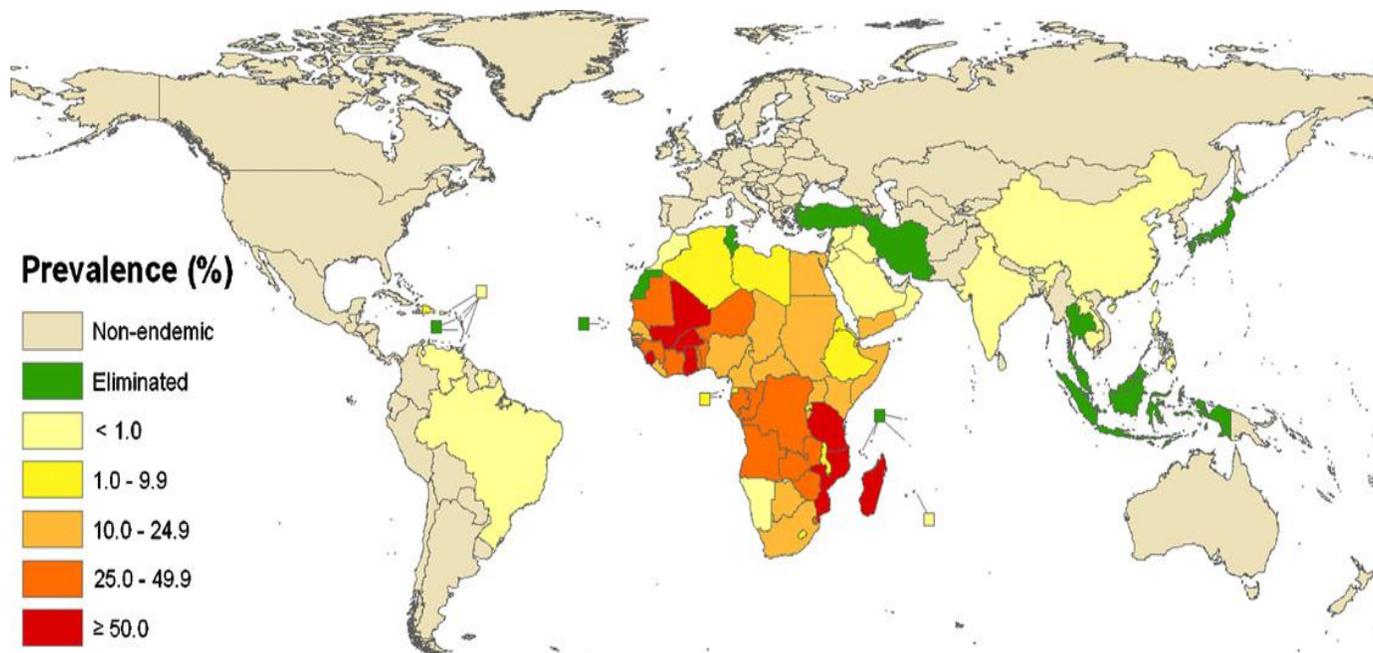


Figura 1. Distribuição mundial das esquistossomoses. Fonte: Utzinger *et al.*, 2011.

No Brasil, cerca de 43 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e 7 milhões estão infectadas, sendo o país mais afetado por esse tipo de esquistossomose das Américas (LAMBERTUCCI, 2010; WHO, 2010).

Atualmente, no país, a transmissão ocorre em 19 estados desde o Rio Grande do Norte até a Bahia, alcançando o interior do Espírito Santo e Minas Gerais. Precisamente, está presente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, no Nordeste; Pará, na região Norte; Goiás e Distrito Federal, no Centro-Oeste; São Paulo e Rio de Janeiro, no Sudeste; Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na região Sul. As prevalências mais elevadas são encontradas nos estados de Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Minas Gerais, Bahia, Paraíba e Espírito Santo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No estado de São Paulo, 170 municípios registraram casos autóctones, sendo as regiões de maior prevalência o Vale do Paraíba, o Vale do Ribeira, Litoral Norte e Baixada Santista, alguns municípios da região metropolitana de São Paulo - incluindo a capital - e o município de Campinas, este último de grande importância epidemiológica (SUCEN, 2004; CASTAGNA, 2010). Em Campinas, os primeiros casos autóctones apareceram em 1960. De 1998 a 2005 foram

identificados 2098 casos, com maior prevalência na região sul do município. A transmissão se dá pelo hospedeiro intermediário encontrado na região, a *B. tenagophila* (SES & SUCEN, 1982; ANARUMA-FILHO *et al.*, 2007).

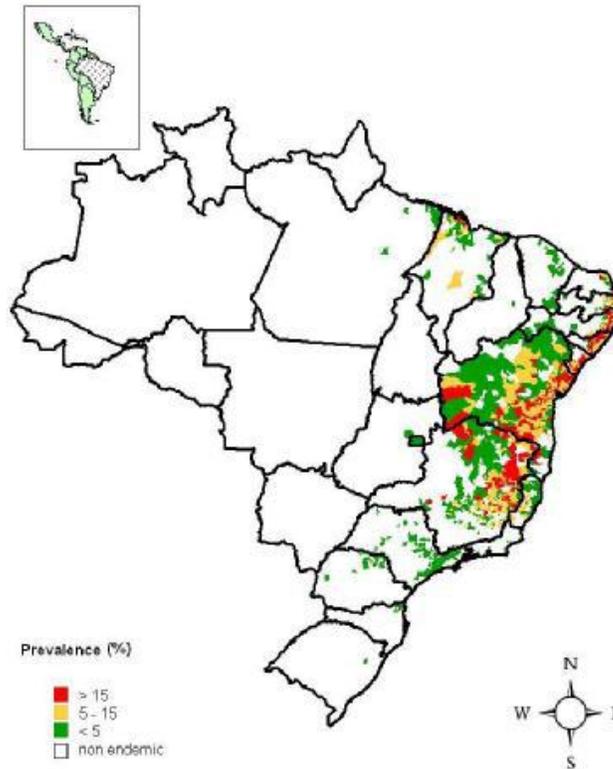


Figura 2. Distribuição da esquistossomose mansônica nos estados brasileiros. Fonte: Ministério da Saúde, 2011.

A espécie *S. mansoni* foi descrita pela primeira vez em 1902 por Manson, ao encontrar ovos contendo um espículo lateral em pacientes nas Antilhas admitindo ser uma nova espécie de *Schistosoma* que posteriormente foi classificado por Sambon, em 1907. A presença dessa mesma espécie foi confirmada pela primeira vez no Brasil por Pirajá da Silva, na Bahia, em 1908 (COURA & AMARAL, 2004).

A introdução da esquistossomose mansônica no Brasil provavelmente ocorreu com o tráfico de escravos africanos. Os fluxos migratórios foram responsáveis pela disseminação do litoral para o interior, coincidindo com regiões onde havia o hospedeiro intermediário (PARAENSE, 1986; AMARAL & PORTO,

1994; COURA & AMARAL, 2004). De acordo com Paraense (1966; 1981), dez espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* são descritas no Brasil, sendo que três delas são hospedeiros intermediários naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*) e duas são consideradas potenciais hospedeiros, pois já foram infectadas experimentalmente (*B. amazonica* e *B. peregrina*).

No Brasil as principais espécies, por ordem de importância, envolvidas na transmissão da doença são: *B. glabrata* (existente em 16 estados – Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe – além do Distrito Federal), *B. straminea* (encontrada em 23 estados - Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins – e também o Distrito Federal) e *B. tenagophila* (presente em 11 estados - Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina – e Distrito Federal) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.2 Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* e patologia

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é complexo envolvendo uma fase de reprodução assexuada, nos hospedeiros intermediários, e uma fase sexuada, pelos vermes adultos nos hospedeiros definitivos. Em condições favoráveis o ciclo completo ocorre em 80 dias (KATZ & ALMEIDA, 2003).

Os ovos do *S. mansoni* são eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo. Na água, ocorre a eclosão da larva ciliada livre-natante, denominada miracídio, que vai em direção ao hospedeiro intermediário por meio de estímulos físicos - gerados pelo ambiente - e químicos - gerados pelo molusco - infectando-os. Neste hospedeiro se transformam em esporocisto primário que, por multiplicação assexuada, geram numerosos esporocistos secundários. Após 4 a 6 semanas cada esporocisto secundário se transforma em cercária, outra larva livre-

natante, que abandona o molusco hospedeiro e, atraída pela luz, nada na superfície da água (XAVIER *et al.*, 1998; YAZDANBAKHSI & DEELDER, 1998; KAPP *et al.*, 2003; KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER *et al.*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006).

O contato humano com águas que contenham cercária, devido a atividades profissionais (como o cultivo de arroz irrigado), domésticas (tais como lavagem de roupas e louças), de lazer e banhos, faz com que o hospedeiro definitivo se infecte. A infecção do hospedeiro definitivo ocorre quando as cercárias penetram ativamente na pele por ação mecânica e enzimática e, então, transformam-se em esquistossômulo. Este, por sua vez, penetra nos vasos sanguíneos, é levado pela circulação para o coração e pulmões e, após 48 horas, para o sistema porta-hepático, onde se tornam adultos machos e fêmeas. (XAVIER *et al.*, 1998; YAZDANBAKHSI & DEELDER, 1998; MCKERROW & SALTER, 2002; KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER *et al.*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006).

Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas, onde ocorrerá oviposição. Parte dos ovos atravessa a parede intestinal, alcança a luz e é eliminado ao meio externo com as fezes. Enquanto isso, outra parte dos ovos é retida nos tecidos, principalmente os do fígado, formando ao redor desses uma reação granulomatosa, causa principal da morbidade da doença (XAVIER *et al.*, 1998; YAZDANBAKHSI & DEELDER, 1998; KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER *et al.*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006). A figura 3 mostra o ciclo evolutivo de *S. mansoni*.

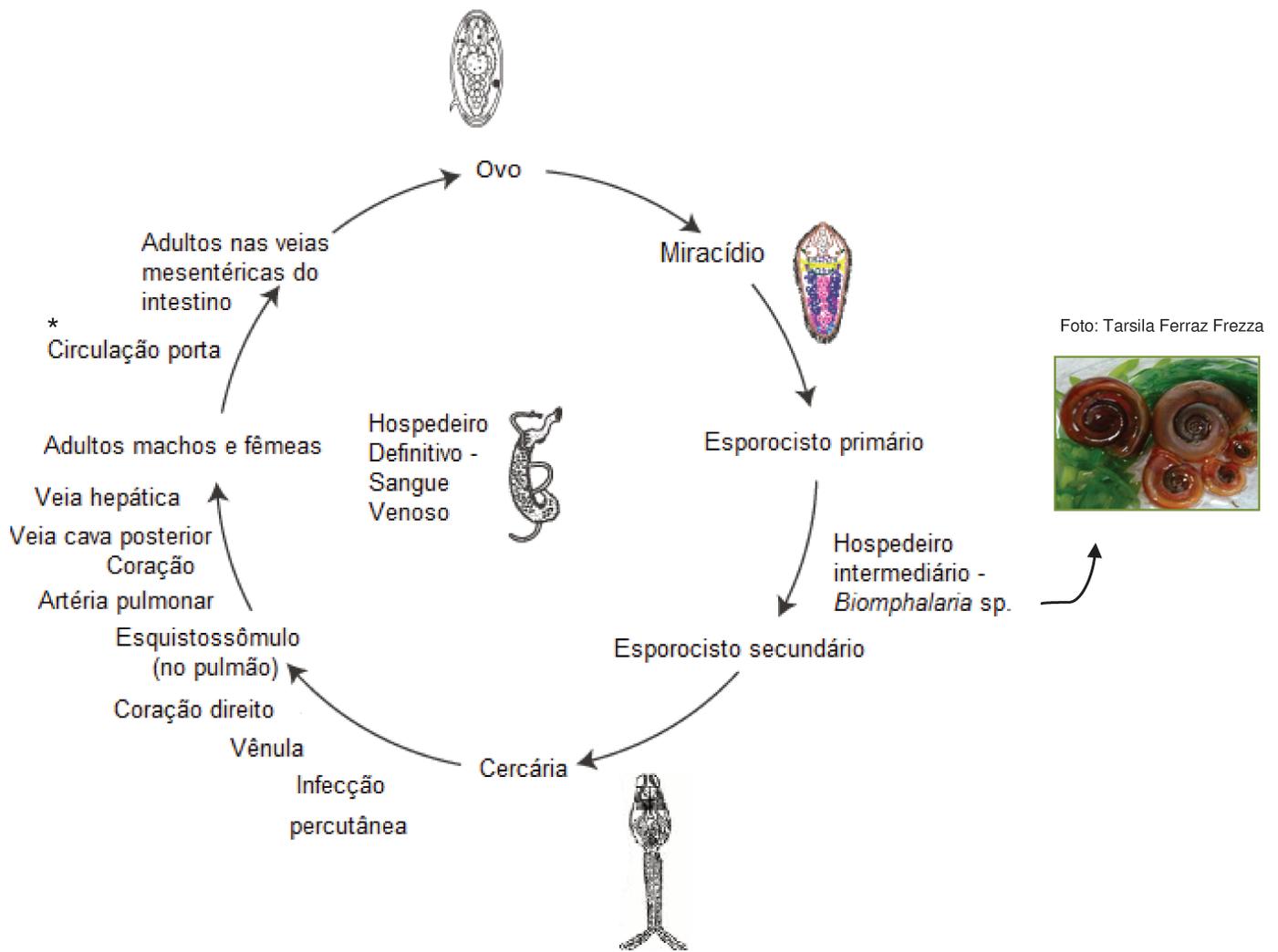


Foto: Tarsila Ferraz Frezza

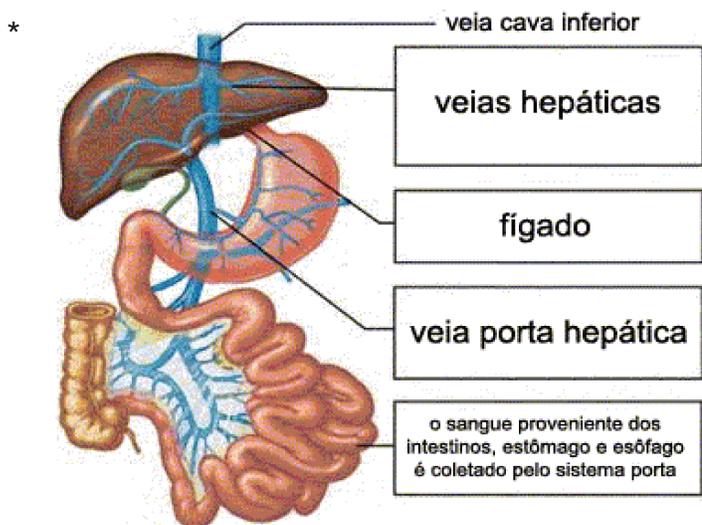


Figura: JORGE (2011).

Figura 3. Ciclo evolutivo de *S. mansoni*. Adaptado de WEB ATLAS OF MEDICAL PARASITOLOGY (2011) e JORGE (2011).

A reação granulomatosa é causada por antígenos solúveis liberados pelos ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos. Primeiramente ocorre uma intensa migração de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos em torno do ovo, o que leva à fibrose da região. Quando há um grande número de áreas fibrosadas em órgãos como fígado e intestino, podem ocorrer hipertensão portal, varizes esofageanas e retais, hemorragias e óbito. As características mais marcantes da patologia da esquistossomose mansônica são a hipertensão portal, hepatoesplenomegalia e ascite (STADECKER, 1992).

A patogenia depende de vários fatores como a carga parasitária, linhagem do parasito, imunidade, estado nutricional e idade do hospedeiro definitivo. As infecções mais graves acometem geralmente os adolescentes e as mais brandas, os adultos. (XAVIER *et al.*, 1998; YAZDANBAKHSI & DEELDER, 1998; KATZ & ALMEIDA, 2003; UTZINGER *et al.*, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006).

Humanos consistem no principal reservatório desta doença, porém, roedores silvestres, primatas, marsupiais, carnívoros silvestres e ruminantes já foram encontrados naturalmente parasitados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.3 Medidas de controle para a esquistossomose mansônica

Um dos maiores problemas nos países onde a esquistossomose mansônica é endêmica, é o controle. O rápido crescimento das cidades e também a falta de recursos impedem que as atividades sanitárias, como suprimentos seguros de água e rede de esgoto adequada, cheguem às áreas peri-urbanas. Dessa forma, se toda a população tivesse acesso à infra-estrutura adequada, a esquistossomose mansônica estaria erradicada (PARISE-FILHO & SILVEIRA, 2001).

Como tentativa de controle dessa parasitose, medidas isoladas ou combinadas poderiam ser usadas tais como controle do hospedeiro intermediário com moluscicida, melhoria das condições de saneamento básico e abastecimento de água, educação sanitária para a população exposta, tratamento individual ou

em massa nas áreas de alta prevalência, proteção individual contra a penetração de cercárias e o desenvolvimento de uma vacina (COURA & AMARAL 2004).

No entanto, essas medidas apresentam empecilhos tais como a larga disseminação do hospedeiro intermediário, além de seus mecanismos de escapes aos moluscidas, aliados aos altos custos e baixa eficácia que esse tipo de controle possui; altos custos associados à implementação de condições sanitárias e suprimento de água adequados, ao lado do intenso contato da população rural com coleções naturais de águas doces poluídas; o longo tempo requerido para que haja uma educação sanitária; tratamentos individuais ou em massa podem ser eficientes para reduzir a morbidade, mas não impedem reinfecções nem o surgimento de tolerância e resistência ao tratamento; o uso de proteção individual é improvável, exceto para grupos específicos de pessoas expostas; finalmente, ainda não existe vacina efetiva para tratamento da esquistossomose (COURA & AMARAL 2004; TENDLER & SIMPSON, 2008).

2.4 A quimioterapia da esquistossomose mansônica

Uma vez que há relatos de hematúria (provocada provavelmente por *S. haematobium*) em papiros onde as práticas médicas eram registradas, datados de 1950-1900 A.C., sabe-se que o tratamento contra a esquistossomose já era feito desde então com um composto denominado "msdmt", identificado como um antimônio (CIOLI *et al.*, 1995; TONKAL & MORSY, 2008). Mais de dois mil anos depois, Christopherson (1918) inicia a quimioterapia "moderna" contra a esquistossomose mansônica ao relatar o tratamento bem sucedido da doença em sua forma urinária (provocada pelo *S. haematobium*), novamente com um antimônio, o tártaro emético (PARISE-FILHO & SILVEIRA, 2001).

Compostos antimoniais de vários tipos foram os medicamentos disponíveis mais usados até a Segunda Guerra Mundial (BRINDLEY, 1994). Entretanto, apesar desses atuarem com eficácia para as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* seu uso clínico foi interrompido por causa dos severos efeitos colaterais e tóxicos que levava, por vezes, na interrupção do

tratamento pela pouca tolerância do paciente ao medicamento (CUNHA,1982; CIOLI *et al.*, 1995; NOVAES *et al.*, 1999).

Antes dos compostos antimonialis caírem em desuso, pesquisas feitas na década de 1920 com a emetina e a 2,3-deidroemetina, fármacos empregados no tratamento de amebíases, mostraram atividade contra *S. japonicum*.

Apesar da emetina ter apresentado boa eficácia, as concentrações necessárias para atuar contra essa espécie representavam duas vezes a requerida para tratamento das amebíases estando no limite da toxicidade. A 2,3-deidroemetina era menos tóxica e apresentava modestos efeitos colaterais comparados à emetina, porém acabou em desuso devido a sua complicada administração uma vez que requeria a internação do paciente por cerca de um mês, período em que receberia injeções diárias desse fármaco (BLANC & NOSNY, 1968; CIOLI *et al.*, 1995).

Após a Segunda Guerra Mundial, houve a descoberta de novos fármacos menos tóxicos, mais ativos, livres de metais e administrados por via oral (CUNHA, 1982; CIOLI *et al.*, 1995). A partir de então o cloridrato de 1-N-*b*-dietil-amino-etil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona, a lucantona (Miracil D[®]), descrita pela primeira vez em 1932, foi o primeiro fármaco esquistossomicida administrado por via oral a ser introduzido na prática médica, sendo eficaz tanto para *S. mansoni* como para *S. haematobium*. Os efeitos colaterais da lucantona geralmente eram limitados a náuseas e vômitos, contudo efeitos graves no coração e sistema nervoso central foram relatados (KIKUTH & GÖNNERT, 1948).

Em 1955, foi introduzido o composto organofosforado 2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfonato de dimetilo como um inseticida de nome genérico triclorfon (LORENZ *et al.*, 1955), que depois foi alterado para metrifonato. Mais tarde, em 1962, foi considerada a possibilidade de se estender o uso desse composto em helmintos e, estudos preliminares em humanos, mostraram evidências de atividade terapêutica para esquistossomose, ancilostomose, ascaridíase, tricuriase e oncocercíase (CERF *et al.*, 1962; DAVIS & BAILEY, 1969; SALAZAR-MALLEN *et al.*, 1969). No entanto, esse composto só se mostrou realmente eficaz para o

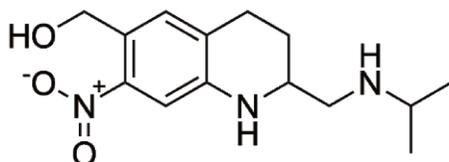
tratamento da esquistossomose urinária (JEWSBURY *et al.*, 1977). Assim, ainda hoje, o metrifonato (Bilarcil[®]) é usado para tratamento dessa esquistossomose, porém, a necessidade de ser administrado em três doses constitui no maior empecilho do uso desse fármaco (KORTE *et al.*, 1986; WHO, 1993; CIOLI *et al.*, 1995; BERGE *et al.*, 2011).

No começo da década de 1960, foi relatada a atividade esquistossomicida de um antimicrobiano de largo espectro, o nitrofurano, que, assim como seus derivados, apresentava efeito anti-*S. japonicum*. Contudo, a atividade sub-ótima, alta toxicidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos fizeram com que esse composto deixasse de ser utilizado, assim como seus derivados, que em alguns casos nem chegaram a ser utilizados para tratamento da esquistossomose humana (WERBEL, 1970; ROBINSON *et al.*, 1970; HULBERT *et al.*, 1973).

Um período de intenso progresso para a terapia contra as esquistossomoses ocorreu após a introdução do niridazol 1-(5-nitro-2-tiazolil)imidazolidina-2-ona), em 1964, (LAMBERT & STAUFFER, 1964) e da hincantona (1-*N*-*b*-dietil-amino-etil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona), em 1965 (ROSI *et al.*, 1965). O niridazol (Ambilhar[®]) apresentava baixa ação para *S. japonicum*, moderada para *S. mansoni* e era altamente eficaz para *S. haematobium*, enquanto que a hincantona (Etrenol[®]) apresentava-se eficaz para *S. mansoni* e *S. haematobium*. No entanto, esses fármacos possuíam certos inconvenientes como o fato do niridazole não poder ser administrado em dose única, além dos inúmeros efeitos colaterais que ocorriam com o uso de ambos os fármacos e que, por vezes, eram considerados graves como a alta toxicidade no sistema nervoso central, rins e fígado, efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Dessa forma, esses fármacos não foram mais utilizados na terapia medicamentosa das esquistossomoses, tanto pelos graves efeitos colaterais, como por não serem considerados seguros o suficiente para utilização em larga escala nas regiões endêmicas (FONTANILLES, 1969; CIOLI *et al.*, 1995).

No final da década de 1960 foi descrita uma série de derivados 2-aminometil-tetra-hidroquinolínicos que apresentavam ação esquistossomicida,

sendo o composto mais promissor, o 2-N-isopropilaminometil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina, designado UK-3883. A hidroxilação do grupo 6-metil deu origem ao UK-4271, posteriormente chamado de oxaminiquina (Mansil[®]/Vansil[®]) e descrito pela primeira vez por Richards & Foster, em 1969 (RICHARDS & FOSTER, 1969; CIOLI *et al.*, 1993, 1995). Sua estrutura química está representada na figura 4.



Oxaminiquina

Figura 4. Oxaminiquina: estrutura química.

Ensaio pré-clínicos demonstraram o potencial esquistossomicida da oxaminiquina para *S. mansoni*, principalmente para os vermes machos (FOSTER & CHEETHAM, 1973). Ensaio clínico feito no Brasil com a dose única de 15 a 20 mg/kg, administrada via oral, mostraram índice de cura de até 90%, além de boa tolerância pelos pacientes. Com esses resultados foi possível que esse fármaco pudesse ser aplicado extensivamente e usado nos programas brasileiros de controle da esquistossomose mansônica (ALMEIDA-MACHADO, 1982; FOSTER, 1987; CIOLI *et al.*, 1993).

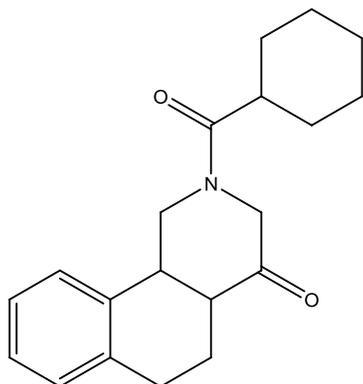
Estudos posteriores indicaram algumas desvantagens no seu uso. Como esse fármaco não tem especificidade celular, o que resulta em toxicidade periférica indesejada, há o surgimento de efeitos colaterais no sistema nervoso central (DAVIS, 1993; SOYEZ *et al.*, 1996). Também foi detectada baixa atividade no período que vai da 3^a a 9^a semana de infecção, coincidindo com a fase de produção de ovos (FRÉZARD & MELO, 1997) além do relato de pacientes infectados por *S. mansoni* resistentes ao tratamento (CIOLI *et al.*, 1992).

Sobre o mecanismo de ação da oxaminiquina, que ainda não é completamente elucidado, acredita-se que esteja relacionado à sua conversão enzimática por meio de uma quinase ou sulfotransferase para um éster, o qual

pode alquilar o DNA do *S. mansoni*. Além disso, possui efeito anticolinérgico o que aumenta a motilidade do *S. mansoni*, ao mesmo tempo em que inibe a síntese de ácidos nucleicos (CIOLI *et al.*, 1993).

Após a descoberta da oxaminiquina, a atividade esquistossomicida da tubercidina (7-dezaadenosina) foi descrita pela primeira vez por Jaffee *et al.* (1971). Foi proposta a administração desse composto juntamente com o nitrobenziltioinosina S-monofosfato (NBMPR-P), em virtude da diminuição da toxicidade. No entanto, a dificuldade de administração em humanos desses dois compostos, fizeram com que o uso da tubercidina na terapêutica das esquistossomoses fosse inviável (EL-KOUNI *et al.*, 1983; CIOLI *et al.* 1995; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006).

No começo da década de 1970, deram-se início a estudos com derivados de pirazinoisoquinolínicos como antiparasitários (ANDREWS, 1981). Após a síntese de vários compostos, o mais promissor revelou ser o 2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolina-4-ona, chamado de EMBAY-8440 e, posteriormente, de praziquantel (Biltricide[®]/Cysticide[®]/Cesol[®]/Distocid[®]/Pyquiton[®]) (CIOLI *et al.*, 1995), cuja estrutura química está representada na figura 5. Esse fármaco, descoberto em 1975 (ANDREWS *et al.*, 1983; DAY *et al.*, 1992), foi inicialmente usado contra cestódeos e restringia-se ao uso veterinário (THOMAS & GONNERT, 1977).



Praziquantel

Figura 5. Praziquantel: estrutura química.

Os primeiros estudos com animais infectados com *Schistosoma* sp. foram feitos em 1977, quando foi detectada a ação esquistossomicida (GONNERT & ANDREWS, 1977) além do amplo espectro de atuação para vermes desse gênero. Estudos posteriores mostraram que o praziquantel atuava contra as espécies *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. matheei*, além de outras espécies de trematódeos (*Opisthorchis sinensis*, *O. viverrini*, *Paragonimus* spp., *Fasciolopsis buski*, *Heterophyes heterophyes* e *Metagonimus yokogawai*) e cestódeos (*Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Diphyllobotrium latum* e *D. pacificum*) (WEBBE & JAMES, 1977; WEGNER, 1984; BOUREE, 1991; UTZINGER *et al.*, 2001; MAINARDES, 2004; SHUHUA, 2005; JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; LIMA, 2006; SHAOHONG *et al.*, 2006).

Ensaio pré-clínicos também demonstraram a eficácia para tratamento de infecções com 5 a 6 semanas e falhas entre a 1ª e 5ª semanas de infecção (GONNERT & ANDREWS, 1977; WEBBE & JAMES, 1977; XIAO *et al.*, 1985; SABAH *et al.*, 1986).

Os primeiros estudos clínicos ocorreram em 1978, em cooperação com a WHO, em regiões endêmicas para *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. intercalatum* (KATZ *et al.*, 1979; DAVIS *et al.*, 1979; ISHIZAKI *et al.*, 1979). Em 1984, os índices de cura reportados foram de 75-85% para *S. haematobium*, 63-85% para *S. mansoni*; 80-90% para *S. japonicum*, 89% para *S. intercalatum* e 60-80% para infecções concomitantes com *S. mansoni* e *S. haematobium* (WEGNER, 1984). Foi comprovado, também, que o praziquantel era bem tolerado por pacientes de todas as idades e com diferentes formas clínicas de esquistossomose, incluindo casos hepatoesplênicos avançados (FROHBERG, 1984; BASSILY *et al.*, 1985), ocorrendo efeitos colaterais brandos nos pacientes (CIOLI *et al.*, 1995). Outros estudos mostraram a baixa toxicidade e ausência de riscos mutagênicos (FROHBERG, 1984; KRAMERS *et al.*, 1991).

Com essas triagens ficou clara a identificação do praziquantel como fármaco de escolha no tratamento das esquistossomoses (CIOLI & PICAMATTOCCIA, 2002). Além disso, foi o primeiro anti-helmíntico a atender os

requisitos da WHO (SILVA *et al.*, 2005; SPERA, 2005). Desde então, nenhum outro avanço terapêutico foi alcançado (CIOLI, 1995).

O mecanismo de ação do praziquantel não é completamente elucidado, porém é provável que a ação anti-helmíntica se deva à inibição da bomba Na⁺/K⁺ do *Schistosoma* sp., aumentando a permeabilidade da membrana do helminto à cátiões, principalmente o cálcio, o que leva a intensificação da atividade muscular seguida de contração e paralisia. Como conseqüência, o verme separa-se dos tecidos do hospedeiro. Também causa a despolarização da membrana tegumentar do verme, redução do nível de ATP e da captura da glicose. Em *S. mansoni* provoca mudanças estruturais no tegumento, seguida pela vacuolização e erosão da superfície o que resulta na exposição dos antígenos que são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro e que leva à morte do parasito (DAY *et al.*, 1992; ISMAIL *et al.*, 1999; NOVAES *et al.*, 1999; MAINARDES, 2004; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2006; TALLIMA & RIDI, 2007). Após a descoberta do praziquantel, pouco avanço foi obtido na terapêutica da esquistossomose mansônica.

Em 1976, o uso do amoscanato (4-isotiocianato-4'-nitrodifenilamina) contra helmintoses foi descrito por Striebel (1976). Nessa época foi demonstrado seu amplo espectro de ação atuando contra a maioria das espécies de *Schistosoma*, filárias e nematódeos gastrointestinais (BUEDING *et al.*, 1976). O amoscanato foi testado em humanos infectados com *S. japonicum*, obtendo índices de cura de até 92%. No entanto, esse fármaco caiu em desuso devido à toxicidade hepática (HUBEI NITHIOCYAMINUM COODINATION RESEARCH GROUP, 1980; CIOLI *et al.*, 1995).

Ainda em 1976 foi sintetizado um derivado de ditioletona chamado oltipraz (BARREAU *et al.*, 1977), ativo contra *S. mansoni*, *S. intercalatum* e *S. haematobium* (LEROY *et al.*, 1978; GENTILINI *et al.*, 1980; KATZ *et al.*, 1984). Ensaios pré-clínicos demonstraram a eliminação de *S. mansoni* (BUEDING *et al.*, 1982) e ensaios clínicos apresentaram índices de cura entre 80 e 95% para essa

espécie. Dos efeitos colaterais observados, o de maior gravidade revelou ser a foto-onicólise, o que levou a retirada do fármaco em 1984 (CIOLI *et al.*, 1995).

Também em 1976, a ação esquistossomicida dos "alkilaminoalkanethio-sulfuric acids" foi descrita pela primeira vez por Nelson & Pellegrino (1976). Ensaios pré-clínicos com *S. mansoni* demonstraram ação preferencial por fêmeas adultas (PENIDO *et al.*, 1999). No entanto, não existem ensaios clínicos até o momento.

Em 1978, uma triagem feita com derivados de benzodiazepinas mostraram que alguns membros desse grupo apresentavam forte ação esquistossomicida, especialmente o (+)-5-(*o*-clorofenil)-1,3-diidro-3-metil-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona) que foi chamado de Ro 11-3128 (STOHLER, 1978). Em estudos pré-clínicos demonstrou ser efetivo para *S. mansoni* e *S. haematobium* (BRICKLE & ANDREWS, 1995). Estudos clínicos confirmaram a atividade esquistossomicida, porém alguns efeitos colaterais, como a forte ação sedativa, desencorajaram o desenvolvimento desse composto (PAX *et al.*, 1978; BAARD *et al.*, 1979).

Na década de 1980, o uso de derivados da artemisinina (extraído de *Artemisia annua*) como anti-*Schistosoma* sp. foi feito pela primeira vez por chineses que demonstraram que a administração desse composto em animais infectados experimentalmente por *S. japonicum*, provocava redução da carga de vermes (CHEN *et al.*, 1980).

Inicialmente esses derivados eram, e ainda são, utilizados extensivamente no controle da malária. Os vários derivados da artemisinina, tais como artemisone, arteeter, ácido artelinico e outros, são genericamente conhecidos por "artemisininas" e foram descobertos na década de 1970 (KRISHNA *et al.*, 2008).

Em 1982, foi também demonstrado que as fases larvárias de *S. japonicum* eram susceptíveis à artemisininas (LE *et al.*, 1982). Estudos posteriores confirmaram ação esquistossomicida para o artesunato e o artemeter, com índices de cura de até 99% para o artemeter (LE *et al.*, 1983; LE *et al.*, 1982). Em 1984,

foi demonstrada a eficácia desses derivados para os estágios juvenis de infecção por *Schistosoma* sp., período em que os tratamentos feitos por praziquantel falham, podendo o artemeter e artesunato serem potenciais candidatos à fármacos profiláticos para as esquistossomoses (YUE *et al.*, 1984; LU *et al.*, 2010). Estudos subseqüentes estenderam a ação dos derivados da artemisinina para outras espécies de *Schistosoma* sp. que parasitam humanos, como os ensaios feitos no Brasil, em 1991, que demonstraram redução da carga parasitária em camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com artemeter (ARAÚJO *et al.*, 1991). Desde então, progressos notáveis tem ocorrido no estudo da ação anti-*Schistosoma* sp. com as artemisininas, em especial o artemeter e o artesunato (CIOLI *et al.*, 2002; XIAO *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2010).

Ensaio clínico com o artemeter já foram realizados na Costa do Marfim (África), demonstrando incidência menor de infecção por *S. mansoni* e *S. japonicum* (UTZINGER *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2000). Em relação à toxicidade foi demonstrado em testes clínicos que as artemisininas são bem toleradas, quando administrados oralmente (NOTPRASERT *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação da artemisinina e seus derivados no *Schistosoma* sp., ainda não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se que o artemeter provoca alterações bioquímicas em tais vermes dentre as quais, as mais notáveis são a diminuição de glicogênio e a inibição de enzimas glicolíticas. A lactato desidrogenase também é reduzida em *Schistosoma* sp., após a administração do artemeter (XIAO *et al.*, 1998; XIAO *et al.*, 1999). Esses dados podem fornecer pistas que um dos alvos da artemisinina e seus derivados sejam as enzimas glicolíticas (LU *et al.*, 2010). Outro derivado da artemisinina, o artesunato, faz com que o endoperoxido do fármaco reaja com a porção heme liberada da digestão da hemoglobina, gerando radicais livres. Proteínas alquiladas por esses radicais, supostamente, causariam danos nos vermes agindo dessa mesma maneira para outros parasitos como *Plasmodium* sp. e *Haemonchus* sp. (MESHNICK *et al.*, 1996; PANDEY *et al.*, 1999; ROBERT *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2007).

Em algumas regiões do mundo há superposição de áreas endêmicas de malária e esquistossomose onde infecções concomitantes podem ocorrer. Assim, é sugerido que nessas regiões, o uso de derivados da artemisinina com o intuito de tratar casos de malária, possa exercer influência na diminuição da taxa de morbidade da endemia esquistossomótica (LESCANO *et al.*, 2004).

Após os primeiros estudos da atividade esquistossomicida das artemisininas, outro fármaco teve a ação anti-*Schistosoma* sp. pesquisada, a ciclosporina A, cuja ação anti-helmíntica foi descoberta por Bueding *et al.*, em 1981. Foi observada redução no número de vermes e supressão na formação de granulomas em camundongos infectados por *S. mansoni* além de seu efeito profilático em infecções para esse verme (BOUT *et al.*, 1986).

Em 1984, uma série de derivados de acridina demonstraram atividade esquistossomicida. Estudos *in vivo* demonstraram sua efetividade contra *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (STOHLER & MONTANOVA, 1984). Ensaio em primatas demonstraram haver cura do hospedeiro para alguns desses derivados, como o denominado RO 15-5458/000 (COELHO & PERERIRA, 1991). É fato que os derivados de acridina constituem numa importante classe de compostos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades anticonvulsivantes, antidepressivos, analgésicos, antiinflamatórios, antiagregantes plaquetários, antimaláricos, antimicrobianos, antifúngicos, vasodilatadores, antitumorais, antivirais e também anti-*Schistosoma* sp. (ROLLAS & KUÇUKGUZEL, 2007).

No final da década de 1990, foi sugerido o uso da Myrh (uma resina aromática obtida do caule de uma espécie de Bursearacae, a *Commiphora molmol* - também denominada *C. myrrha*) no combate à esquistossomose provocada pelas espécies *S. mansoni* e *S. haematobium*. No Egito, foram produzidas cápsulas gelatinosas dessa resina, chamadas de Mirazid[®] (GREENE, 1993; MASSOUD, 1999; BADRIA *et al.*, 2001; ABDUL-GHANI *et al.*, 2009).

Ensaio pré-clínicos e clínicos, no entanto, demonstraram que a eficácia do Mirazid[®] era dependente da linhagem do parasito, podendo-se obter resultados

hora significativos, hora modestos. Por essa razão, o uso dessa resina no tratamento da doença é discutível.

Atualmente, as pesquisas mais recentes na procura de um composto ou fármaco de ação esquistossomicida, vêm sendo feitas com inibidores de protease cisteína, como por exemplo, o K11777, tido com um potente esquistossomicida e diminuidor da patogenia na esquistossomose experimental (ABDULLA *et al.*, 2007); RNAi, na tentativa de desenvolver fármacos ou compostos que atuem como silenciadores de enzimas, como por exemplo, o composto 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-3-carbonitrila-2-óxido ou furoxan, que atua na tioredoxina-glutationa redutase de *S. mansoni* (KUNTZ *et al.*, 2007; SAYED *et al.*, 2008); trioxolanos ou ozonoides secundários (1,2,4-trioxolanos), que compreendem numa classe de endoperoxidos sintéticos, relativamente baratos e fáceis de sintetizar, análogo às artemisininas e com atuação nas infecções experimentais por *S. mansoni* e *S. japonicum* (CAFFREY, 2007; XIAO *et al.*, 2007); mefloquina (um anti-malárico) que mostrou efeito esquistossomicida para vermes jovens e adultos de *S. mansoni* (VAN-NASSAUW *et al.*, 2008; KEISER *et al.*, 2009); ácido araquidônico que apresentou propriedades esquistossomicidas para *S. mansoni* e *S. haematobium* (EL-RIDI *et al.*, 2010) e com a miltefosina (um anti-leishmaniose) que reduziu a carga parasitária de camundongos infectados por *S. mansoni* (EISSA *et al.*, 2011). Até o momento não há ensaios clínicos com esses compostos.

Também são feitas pesquisas com plantas medicinais, que recentemente tem ganhado bastante destaque. De acordo com a WHO, pesquisas com essas plantas para combate às esquistossomoses são encorajadas, já que há o reconhecimento dessa organização que o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade consiste num importante instrumento no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate de doenças que acometem a população de países em desenvolvimento (WHO, 2002).

A tabela 1. mostra os diferentes medicamentos anti-*Schistosoma* já utilizados para o tratamento da esquistossomose humana, além de sua ação para outros parasitos.

Tabela 1. Fármacos e compostos com ação esquistossomicida já testados em humanos.

ANO	FÁRMACO/COMPOSTO	ESPÉCIE	OUTROS PARASITOS
1918 - 1927	Tártaro Emético - Compostos Antimoniais	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i>	Protozoários: <i>Leishmania</i> sp.
1920	Emetina e 2,3-deidroemetina	<i>S. japonicum</i>	Protozoários: <i>Entamoeba</i> sp.
1932	Lucantona	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	-
1955	Metrifonato	<i>S. haematobium</i>	Nematódeos
1964	Niridazol	<i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i>	Protozoários: <i>Trichomonas</i> sp. e <i>Entamoeba</i> sp.
1965	Hicantona	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. rodhaini</i>	-
1969	Oxaminiquina	<i>S. mansoni</i>	-
1975	Praziquantel	<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S.</i> <i>haematobium</i> , <i>S.</i> <i>intercalatum</i> , <i>S. mekongi</i>	Outros Trematódeos e Cestódeos
1976	Amoscanato	<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i>	Nematódeos
1976	Oltipraz	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. intercalatum</i>	-
1978	Benzodiazepinas	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	-
1980	Artemisinina e derivados	<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S.</i> <i>haematobium</i>	Protozoários: <i>Plasmodium</i> sp.
1998	Myrh	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	-

Fonte: CIOLI *et al.*, 1995; HARDER, 2002; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006; ABDUL-GHANI *et al.*, 2009.

2.5 Desenvolvimento de tolerância e resistência aos fármacos esquistossomicidas e a busca por novas alternativas

Atualmente, a oxaminiquina e o praziquantel são os únicos fármacos empregados no tratamento da esquistossomose mansônica na África e nas Américas (FERRARI *et al.*, 2003). No entanto, a distribuição da oxaminiquina não

é adequada, uma vez que a única indústria farmacêutica que a produz e comercializa mantém sua produção reduzida, legando ao praziquantel, praticamente, a única forma de tratamento da esquistossomose mansônica (KUSEL & HAGAN, 1999).

Desde a década de 1950, sabe-se que linhagens diferentes de *S. mansoni* apresentam diferenças na resposta a tratamentos feitos com os mesmos fármacos (KATZ, 2008). Nessa época foi demonstrado que a do Egito era menos susceptível ao tratamento com Miracil D[®] do que a da Libéria (GONNERT & VOGEL, 1955).

Os primeiros casos de resistência a fármacos esquistossomicidas ocorreram com a oxaminiquina e a hancantona, no Brasil (KATZ *et al.*, 1973). Posteriormente, estudos no Quênia (onde doses mais altas de oxaminiquina são requeridas em comparação ao Brasil) sugeriram a existência de vermes resistentes antes mesmo do uso extensivo de quimioterápicos esquistossomicidas (COLES *et al.*, 1987). Em 1987, Kinoti propôs que o *S. mansoni* poderia desenvolver resistência a doses terapêuticas de determinados fármacos, quando a grande variação na suscetibilidade a fármacos encontrada no parasito, mesmo naqueles provenientes de uma mesma região, já era conhecida.

Em 1994, Fallon & Doenhoff demonstraram experimentalmente que doses subterapêuticas de praziquantel sobre várias gerações de parasitos produziam vermes menos sensíveis ao fármaco.

A resistência ao praziquantel foi, de fato, reportada pela primeira vez em 1995 no Egito e em Senegal (FALLON *et al.*, 1995; ISMAIL *et al.*, 1996).

Tanto a oxaminiquina como o praziquantel apresentam, portanto, casos de tolerância e resistência em virtude do uso regular desses medicamentos para o controle da parasitose (LIANG *et al.*, 2001). É relatado que diferentes cepas têm se mostrado mais ou menos susceptíveis a tratamentos, sejam oriundas de uma mesma região geográfica, ou de diferentes indivíduos numa mesma comunidade (PARISE-FILHO *et al.*, 2001; KATZ, 2008).

Dessa forma, a resistência se torna um problema quando a quimioterapia é utilizada em massa, caso da China e Egito – os únicos países a utilizarem quimioterapia em massa para controle da esquistossomose mansônica - visando erradicar a parasitose apenas com uso de medicamentos, ainda mais quando as taxas de cura não atingem 100%. Isso porque, a “chave” desse processo consiste na porcentagem de vermes sobreviventes à quimioterapia que irão contribuir para a resistência da próxima geração (ISMAIL *et al.*, 1999; LIANG *et al.*, 2001). Assim, a resistência contribui para baixas taxas de cura e rápidas reinfecções logo após o tratamento (STELMA *et al.*, 1995). O uso extensivo do fármaco, dessa maneira, aumentou a preocupação sobre o desenvolvimento de *Schistosoma* sp. resistente ao tratamento (FALLON & DOENHOFF, 1994).

Assim, de acordo com a World Health Organization (WHO), em relação à esquistossomose mansônica, existe a necessidade constante de pesquisas nas seguintes áreas: desenvolvimento de vacina, ferramentas simples de aplicação em campo para o diagnóstico (como testes para antígenos circulantes na saliva, por exemplo) e a busca continuada por fármacos (WHO, 1998).

Segundo Cioli *et al.* (1995), a necessidade de novos fármacos é evidente, já que embora existam esforços em pesquisas, até a presente data, não há vacinas eficazes contra doenças parasitárias. Assim, o tratamento medicamentoso antiparasitário continua sendo o método mais eficaz. (DATE *et al.*, 2007). Faz-se necessário, portanto, ou a melhoria dos fármacos que já existem para o tratamento da esquistossomose mansônica, ou o desenvolvimento de novos medicamentos. Ainda segundo esse autor, o custo do desenvolvimento de compostos seguros e efetivos é extremamente alto, chegando-se ao desânimo quanto ao sucesso na introdução de novos esquistossomicidas no futuro.

Sendo assim, pesquisas com plantas medicinais consistem numa alternativa bastante viável. O uso das plantas medicinais também pode constituir numa alternativa terapêutica muito útil tanto pela sua eficácia como pela relativa facilidade para aquisição dessas plantas no Brasil, devido a grande diversidade da flora nativa (MATOS, 1994).

2.6 As plantas medicinais

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados eram retirados da natureza, ou seja, de plantas, animais e minerais (MACIEL *et al.*, 2002; VIEGAS *et al.*, 2006; CALIXTO & SIQUEIRA-Jr., 2008). No entanto, apenas no século XIX, iniciou-se a procura pelos princípios ativos das plantas medicinais, criando-se os primeiros medicamentos com as características que são conhecidas até o presente (CALIXTO & SIQUEIRA-Jr., 2008).

O conhecimento sobre plantas medicinais simbolizou, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, um terço da população mundial necessita de medicamentos essenciais e, dessa forma, recorrem a fitoterapia como única fonte de tratamento. Assim, as observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das suas virtudes terapêuticas, baseadas em informações que foram acumuladas durante séculos (MACIEL *et al.*, 2002; WHO, 2003).

Nesse sentido, países com rica biodiversidade, como é o caso do Brasil - que possui mais de 50.000 espécies de plantas superiores catalogadas, compreendendo 20 a 22% do total existente no planeta -, possuem conhecimentos tradicionais abundantes em relação ao uso de plantas medicinais. Estima-se que as populações indígenas brasileiras dominem a aplicação medicinal de 1300 plantas nativas (ANTHONY *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2007).

É observado que nas regiões mais pobres e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras-livres, mercados populares e também encontradas em residências (MACIEL *et al.*, 2002).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, criada no Brasil em 2005, com os objetivos de melhorar a atenção à saúde, usar de modo sustentável a biodiversidade brasileira, promover fortalecimento da agricultura familiar, gerar emprego e renda e da perspectiva de inclusão social e regional

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), aumentou o interesse por pesquisas com plantas medicinais.

Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou uma lista com 71 plantas de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), com o objetivo de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população brasileira. Nesta lista está a *Cordia verbeceae* (“erva-baleeira”/ “salicina”) (SOUZA *et al.*, 2009).

Conforme Calixto & Siqueira-Jr (2008), o mercado brasileiro de medicamentos pode ser considerado expressivo, uma vez que o Brasil encontra-se num processo de crescimento, aumento do PIB e distribuição de renda, podendo causar aumentos significativos nesse mercado. Além disso, ocupa o 9º lugar no mercado mundial de medicamentos, tendo sido comercializados em 2006, mais de 8 bilhões de dólares nesse setor (IMS, 2006). Entre março de 2006 à fevereiro de 2007, houve um crescimento de 12% da indústria farmacêutica brasileira (IMS, 2007). Apesar disso, a indústria farmacêutica nacional, ainda é incipiente, sendo considerada uma indústria de transformação (CALIXTO & SIQUEIRA-Jr., 2008).

O estudo das plantas medicinais nos países tropicais é interessante, já que as espécies de plantas tropicais possuem 3 a 4 vezes mais constituintes químicos que as de regiões temperadas. Além disso, a descoberta de novos medicamentos a partir de uma planta medicinal faz com que esforços de conservação sejam direcionados para aquele local, o que é muito importante em se tratando de regiões de florestas tropicais (RODRÍGUES & WEST, 1995).

As florestas tropicais são ótimas fontes de recurso já que, segundo Mors *et al.* (2000), essas contêm mais do que a metade das 500.000 espécies de plantas catalogadas no mundo, sendo que dessas, apenas 1% tem suas propriedades medicinais estudadas. No Brasil, com exceção da Amazônia, poucos estudos com plantas medicinais de outras regiões são reportados como as de Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Cerrado (FIGUEIREDO, 1997).

Funari & Ferro (2005), consideram que com a expansão mundial que o mercado de produtos derivados de plantas vem conquistando (como por exemplo: fitoterápicos, suplementos alimentares, cosméticos, repelentes de insetos e corantes), e que 25% dos fármacos empregados atualmente nos países desenvolvidos advêm direta ou indiretamente de produtos naturais (YUNES & CALIXTO, 2001), vê-se que os países detentores de grande biodiversidade podem participar dos mercados bilionários como o de suplemento alimentares e o farmacêutico.

O uso de plantas medicinais no combate à esquistossomose ocorreu pela primeira vez, de fato, com a introdução da emetina e a deidroemetina na terapêutica clínica. Esses compostos são alcalóides extraídos da Rubiaceae *Cephaelis ipecacuanha*, popularmente conhecida por "ipeca". A tabela 2 mostra extratos ou compostos estudados nos últimos dez anos, com comprovada ação anti-*S. mansoni*.

Tabela 2. Extratos e compostos de plantas com comprovada ação anti-*S. mansoni*.

Nome científico	Nome popular	Partes utilizadas da planta	Extrato/Composto	Observações	Referências
<i>Abrus precatorius</i> (Fabaceae)	Olho-de-cabra	Caule e raiz	Extrato Aquoso	Teste <i>in vitro</i> - esquistossômulo	MOLGAARD <i>et al.</i> , 2001
<i>Ozoroa insignis</i> (Anacardiaceae)	-	Folhas e raiz	Extrato Aquoso	Teste <i>in vitro</i> - esquistossômulo	MOLGAARD <i>et al.</i> , 2001
<i>Elephantorrhiza goetzei</i> (Mimosaceae)	-	Caule	Extrato Aquoso	Teste <i>in vitro</i> - esquistossômulo	MOLGAARD <i>et al.</i> , 2001
<i>Commiphora molmol</i> (Bursearaceae)	Mirra	Caule	Myrrh	-	SHEIR <i>et al.</i> , 2001; EL BAZ <i>et al.</i> , 2003; BARAKAT <i>et al.</i> , 2005
<i>Nigella sativa</i> (Ranunculaceae)	Aleprive	Sementes	Óleo essencial, Extratos Aquoso, Etanólico e Clorofórmico	Teste <i>in vivo</i> com linhagem egípcia (óleo) e <i>in vitro</i> com miracido, cercárias e adultos (extratos)	MAHMOUD <i>et al.</i> , 2002; MOHAMED <i>et al.</i> , 2005; EL-SHENAWY <i>et al.</i> , 2008

REVISÃO DA LITERATURA

<i>Allium sativum</i> (Liliaceae)	Alho	Folhas	Extrato Aquoso, Extrato Bruto Seco	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem Egípcia	RIAD <i>et al.</i> , 2007; MANTAWY <i>et al.</i> , 2011
<i>Clerodendrum umbellatum</i> (Verbenaceae)	"Umbel Clerodendrum"	Folhas	Extrato Aquoso	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem de Camarões	JATSA <i>et al.</i> , 2009
<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	Açafrão	—	Curcumina	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem LE	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2009
<i>Zanthoxylum naranjillo</i> (Rutaceae)	Espinho-cinza	Folhas	Fração de Etilacetato	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem LE	BRAGUINE <i>et al.</i> , 2009
<i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae)	Capixingui	Folhas	Ácido cariônico	Teste <i>in vitro</i> - cercárias	MEDINA <i>et al.</i> , 2009
<i>Dryopteris sp.</i> (Dryopteridaceae)	Samambaia	Rizoma	Floroglucinol	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem LE	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2010
<i>Piper tuberculatum</i> (Piperaceae)	Pimenta	Inflorescência	Piplartina	Teste <i>in vitro</i> - linhagem BH	MORAES <i>et al.</i> , 2010
<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae)	Alecrim do campo	Folhas	Óleo Essencial	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem LE	PARREIRA <i>et al.</i> , 2010
<i>Cratylia mollis</i> (Leguminosae)	Camaratuba	Sementes	Cramoll 1,4	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem BH	MELO <i>et al.</i> , 2011
<i>Chenopodium ambrosoides</i> (Chenopodiaceae)	Erva-de-Santa- Maria	n. c.*	Extrato metanólico	Teste <i>in vivo</i> - linhagem egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2011
<i>Conyza dioscorides</i> (Compositae)	Conízia	n. c.	Extrato metanólico	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem Egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2011
<i>Sesbania sesban</i> (Fabaceae)	Sesbânia	n. c.	Extrato metanólico	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem Egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2011
<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Gengibre	Rizoma	Extrato Aquoso	Teste <i>in vivo</i>	SANDERSON <i>et al.</i> , 2002; MOSTAFA <i>et al.</i> , 2011
<i>Ageratum conyzoides</i> (Asteraceae)	Mentrasto	Folhas	Óleo Essencial	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem LE	MELO <i>et al.</i> , 2011
<i>Allium cepa</i> (Liliaceae)	Cebola	Folhas	Extrato Bruto Seco	Teste <i>in vivo</i> - Linhagem Egípcia	METWALLY, 2006; MANTAWY <i>et al.</i> , 2011

REVISÃO DA LITERATURA

<i>Anagallis arvensis</i> (Myrsinaceae)	"Scarlet Pimpernel"	n.c.	Extrato Metanólico	Teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> - cercárias de Linhagem Egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2010
<i>Solanum nigrum</i> (Solanaceae)	"Black Night Shade"	n. c.	Extrato Metanólico	Teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> - cercárias de Linhagem Egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2010
<i>Calendula officinalis</i> (Asteraceae)	Calêndula	n. c.	Extrato Metanólico	Teste <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> - cercárias de Linhagem Egípcia	KAMEL <i>et al.</i> , 2010
<i>Baccharis trimera</i> (Asteraceae)	Carqueja	Folhas	Extrato Diclorometânico	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem BH	ALLEGRETTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Phyllanthus amarus</i> (Euphorbiaceae)	Quebra-pedra	Folhas	Frações 1, 3 e 4 obtidas do extrato etanólico	Teste <i>in vitro</i> - Linhagem BH	ALLEGRETTI <i>et al.</i> , 2011

*n. c. - Não citado.

2.7 *Cordia verbenacea*

A *Cordia verbenacea* DC (também referida por outros nomes científicos: *C. salicina*, *C. curassavica*, *C. cylindristachia*, *Lithocardium fresenii*, *L. salicinum* e *L. verbaceum*) é uma planta medicinal nativa do Brasil, popularmente conhecida por “erva-baleeira” ou “salicina”. Pertence à família Boraginaceae e é amplamente distribuída ao longo da costa brasileira, encontrada principalmente do litoral de São Paulo à Santa Catarina (DE-CARVALHO *et al.*, 2004). Espécies do gênero *Cordia* são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, sul da África, Austrália, Guiana e América do Sul (FICARRA *et al.*, 1995). A figura 6 mostra essa espécie.



Figura 6. *C. verbenacea*: (A) Exemplar e (B) Inflorescência. Fonte: CPQBA-Unicamp.

Vários compostos são encontrados nas suas partes aéreas, incluindo taninos, flavonoides, mucilagens além de óleos essenciais. Essas partes, folhas e inflorescências, têm sido utilizadas na medicina popular, na forma de extratos alcoólicos e infusões por causa de sua atividade anti-úlceras, anti-microbiana, anti-inflamatória, anti-reumática e pelas suas propriedades tônicas e analgésicas (SERTIÉ *et al.*, 1990; DE-CARVALHO *et al.*, 2004; PASSOS *et al.*, 2007).

Devido à diversidade de grupos químicos encontrados em extratos dessa planta que supostamente apresentam atividades biológicas, essa constitui num importante material para investigação farmacêutica (MICHIELIN *et al.*, 2009). Nos últimos anos, as ações dos diferentes extratos de *C. verbenacea* vêm sendo amplamente discutidas.

Estudos pré-clínicos evidenciaram que o extrato hidroalcoólico apresenta ação anti-inflamatória, seja administrado por via oral ou tópica. Também foi confirmada a ação protetora da mucosa gástrica (SERTIE *et al.*, 2005).

A ação anti-oxidante do extrato etanólico foi recentemente investigada (MICHIELIN *et al.*, 2011), além de sua atividade para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*), e Gram-

negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), obtendo-se inibição do crescimento de tais bactérias (MECCIA *et al.*, 2009; MICHIELIN *et al.*, 2009) e atividade anti-úlceras (ROLDÃO *et al.*, 2008).

Já foi reportado que o extrato metanólico obtido das folhas, possui efeitos na formação de edemas e diminui a miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (TICLI *et al.*, 2005).

Ensaios *in vivo* em camundongos demonstraram que o extrato diclorometânico tem ação antiedematogênica (BAYEUX *et al.*, 2002).

O óleo essencial de *C. verbenacea* possui atividade anti-microbiana, pois já foi relatada a inibição do crescimento de algumas bactérias Gram-positivas em culturas *in vitro* além de ação anti-alérgica. Este óleo é composto principalmente de mono e sesquiterpenos, dos quais os principais constituintes são pineno, trans-cariofilleno e aloaromadendreno. Outros constituintes incluem humuleno, espatulenol, gurjuneno e epoxicariofileno (DE-CARVALHO *et al.*, 2004). O isolamento bio-guiado do óleo essencial, levou à identificação de dois compostos ativos com ação anti-inflamatória, o alfa-humuleno e o trans-cariofileno (PASSOS *et al.*, 2007).

Devido a ação anti-inflamatória do óleo essencial, foi possível desenvolver o primeiro fitomedicamento brasileiro (o “Acheflan[®]”), um antiinflamatório de uso tópico. O óleo essencial também revelou ter ação anti-alérgica (PASSOS *et al.*, 2007), além de ser larvicida para *Aedes aegypti* (SANTOS *et al.*, 2006).

Compostos isolados das folhas dessa planta, como o flavonoide artemetina e o composto polifenólico rosmarínico, contribuem para os efeitos anti-inflamatórios sistêmicos, diminuição na formação de edemas e da miotoxicidade (SERTIÉ *et al.*, 1990).

A atividade anti-parasitária de extratos de *C. verbenacea* (nesse caso, do metanólico) já foi pesquisada para *Leishmania* sp. (BRAGA *et al.*, 2007) e, no presente trabalho, estudada para *S. mansoni*. Devido às suas propriedades anti-inflamatórias (tendo em vista que as reações inflamatórias ao redor dos ovos do

parasito no fígado constituem na principal patogenia da esquistossomose mansônica), essa espécie foi escolhida para estudos *in vitro*.

A tabela 3. mostra resumidamente as atividades farmacológicas comprovadas de *C. verbenacea*.

Tabela 3. Atividades comprovadas dos diferentes extratos e compostos isolados de *C. verbenacea*.

Nome Científico	Tipo de Amostra (Extrato ou Composto)	Atividade	Referência
<i>Cordia verbenacea</i>	Extrato Hidroalcoólico	Anti-inflamatória, Protetor da mucosa gástrica	SERTIÉ <i>et al.</i> , 2005;
	Extrato Etanólico	Antimicrobiana, Antioxidante, Anti-úlceras	CARVALHO <i>et al.</i> , 2004; ROLDÃO <i>et al.</i> , 2008; MECCIA <i>et al.</i> , 2009; MICHIELIN <i>et al.</i> , 2009
	Extrato metanólico	Diminuição de miotoxicidade, Anti-pasasitária (<i>Leishmania</i> sp.)	TICLI <i>et al.</i> , 2005; BRAGA <i>et al.</i> , 2007
	Extrato diclorometânico	Antiedematogénica	BAYEUX <i>et al.</i> , 2002
	Óleo essencial	Anti-alérgica, Ação larvívica (<i>Aedes aegypti</i>), Anti-microbiana, Anti-inflamatória, Protetor da mucosa gástrica	CARVALHO <i>et al.</i> , 2004; SERTIÉ <i>et al.</i> , 2005; SANTOS <i>et al.</i> , 2006; PASSOS <i>et al.</i> , 2007; Meccia <i>et al.</i> , 2009
	Artemetina	Anti-inflamatória	SERTIÉ <i>et al.</i> , 1990
	Rosmarínico	Diminuição de edemas e miotoxicidade	SERTIÉ <i>et al.</i> , 1990

2.8 Bioensaíos

O aumento da prevalência de helmintos parasitos resistentes aos antihelmínticos convencionais, tem sido um estímulo para diferentes programas que exploram abordagens alternativas para controle das parasitoses (JACKSON & COPP, 2000).

Dado ao interesse mundial em explorar atividades antihelmínticas de plantas e seus produtos, é compreensível um crescente interesse em encontrar a melhor forma de se “medir” a sua bioatividade. O tempo e os custos financeiros envolvidos nos testes faz com que as técnicas de triagem, ou “screening”, tenham

que ser sensíveis, preferencialmente com baixo custo e reproduzíveis (JACKSON & COPP, 2000).

Os compostos bioativos de plantas geralmente contêm um grande número de metabólitos secundários, que podem atuar individualmente ou em combinação, para produzir efeitos diretos ou indiretos nos parasitos. Dessa forma, a primeira fase da triagem, portanto, deve reduzir o número de candidatos para a próxima fase, que consiste na descoberta dos compostos ativos, sendo esse um processo mais complexo e caro. Essa fase é muito importante, já que entender a natureza dos compostos ativos, seu modo de ação e seus alvos nos parasitos, vão determinar sua aplicabilidade (JACKSON & COPP, 2000).

Ensaio *in vivo* e *in vitro*, podem ser usados para triagem. Os testes *in vitro* constituem numa triagem primária, já que um grande número de plantas podem ser examinadas, contudo, podem apenas demonstrar o efeito potencial de uma determinada planta ou extrato (CABARET *et al.*, 2002, ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004; KETZIS *et al.*, 2006).

Os parâmetros mais comumente analisados durante um teste *in vitro* para helmintos são o desenvolvimento das larvas em vermes adultos e a viabilidade dos adultos, em que são observadas a motilidade, oviposição, alterações tegumentares e em órgãos internos, acasalamento e morte desses indivíduos.

É importante lembrar, no entanto, que os testes *in vitro* irão, inevitavelmente, mostrar uma série de aspectos positivos que poderão ser diferentes nas condições físico-químicas do organismo do hospedeiro, podendo apresentar pouca ou nenhuma atividade *in vivo* (JACKSON & COPP, 2000).

Nos testes *in vivo*, a avaliação da atividade do extrato deve seguir alguns critérios quantitativos como quantidade/porcentagem de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras, proporção entre machos e fêmeas, redução do número de vermes e de ovos eliminados para o ambiente externo ou retidos nos tecidos (CABARET *et al.*, 2002; ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004; KETZIS *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a ação das amostras derivadas de *C. verbenacea* e da artemetina em adultos de *S. mansoni*, *in vitro* e *in vivo*, visando à obtenção de uma nova alternativa terapêutica para a esquistossomose mansônica.

3.2 Objetivos específicos

- Obter as amostras derivadas de *C. verbenacea*;
- Analisar *in vitro* a ação dessas amostras e da artemetina sobre a viabilidade de casais adultos de *S. mansoni* por meio de alterações na motilidade, tegumento, estruturas internas, acasalamento, oviposição, contração muscular e mortalidade, bem como determinar suas DLs 50 e/ou 90.
- Analisar *in vivo* a ação das amostras de maior atividade *in vitro*, avaliando as alterações na postura dos ovos e sua ação na sobrevivência dos vermes adultos;
- Analisar a ação dessas na formação de granulomas no fígado, intestino, baço e pulmões de camundongos infectados com o helminto, por meio de observações histológicas;
- Analisar a ação dessas sobre as alterações morfológicas no tegumento de machos e fêmeas do verme, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

A *C. verbenacea* utilizada foi cultivada no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP) situado na cidade de Paulínia-SP. Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número UEC 112744 Fernando de Oliveira (identificador).

4.2 Fitoquímica

4.2.1. Obtenção do Óleo Essencial (OE) de *C. verbenaceae*

O óleo essencial (OE) foi obtido a partir de 400 kg das folhas frescas por arraste a vapor em um sistema de destilação composto por uma dorna de inox acoplada a um condensador de serpentina de aço inox com capacidade para 450 L. Após 1 hora e 30 minutos de extração, o OE foi recolhido em vaso separador de aço inox, separado em funil de separação e estocado em freezer.

4.2.2 Obtenção do Extrato Etanólico (EE) e Frações Aquosa (FAEE) e Orgânica (FOEE)

Parte das folhas úmidas resultantes da extração do OE (10 kg) foram extraídas com etanol 96% (70 L) por agitação mecânica (80 rpm) durante 6 horas à temperatura ambiente, seguido de filtração à vácuo. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo até a observação de formação de em duas fases. As frações aquosa - FAEE (menos densa) - e orgânica - FOEE (mais densa) - foram separadas e evaporadas à vácuo em rotoevaporador, analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e submetidas aos ensaios de atividade anti-*S. mansoni*.

4.2.3. Fracionamento da FOEE em Coluna Seca

A FOEE (1,15 g) foi fracionada em coluna seca utilizando como suporte membrana de acetato de celulose (diâmetro de 1,5 cm) empacotada com sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200mm) até 40 cm de altura, utilizando diclorometano e

metanol (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) como eluente. Após término da eluição, a coluna foi cortada em 4 frações de 10 cm e as frações foram transferidas individualmente para frascos do tipo “snap-cap” e ressuspensas em acetato de etila, analisadas por CCD e em seguida, as frações semelhantes foram agrupadas e filtradas à vácuo, lavando-se os resíduos das sílicas com acetato de etila. Após evaporação do solvente em rotaevaporador foram obtidas as seguintes frações: F1-2, F3 e F4-5. As frações foram analisadas por CCD e submetidas aos ensaios de atividade anti-*S. mansoni*.

4.2.4. Fracionamento da F3 em Coluna Seca

A F3 (0,25 g) foi fracionada em coluna seca de modo análogo ao descrito acima e após término da eluição, a coluna foi cortada em 9 frações de 5 cm e as frações transferidas individualmente para frascos adequados e ressuspensas em acetato de etila, analisadas por CCD e em seguida, as frações semelhantes foram agrupadas e filtradas à vácuo, lavando-se os resíduos das sílicas com acetato de etila. Após evaporação do solvente em rotaevaporador foram obtidas as frações F3.5, F3.6 e F3.7-3.9. As frações F3.1-F3.4 foram descartadas. As frações foram analisadas por CCD e submetidas aos ensaios de atividade anti-*S. mansoni*.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O EE, FOEE e FAEE e frações obtidas das colunas secas (refracionamentos) foram analisados por CCD, utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck. Os eluentes utilizados nas análises foram definidos de acordo com as características dos compostos presentes nas amostras. As placas foram analisadas sob luz UV (l 254 e 366 nm), seguidas de revelação com solução de anisalaldeído e aquecimento em estufa a 100°C.

4.4 Solubilização das Amostras

O OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina foram solubilizados em solução tampão PBS 2% (Phosphate Buffered Saline), usada como veículo,

acrescentando 0,05% de Dimetil Sulfoxido *minimun* (DMSO) 99,5% para a FOEE, refracionamentos e artemetina. Foi utilizado banho de ultrassom durante o processo de solubilização.

4.5 Estudos de Atividade Biológica

Essa etapa do projeto foi desenvolvida no Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Helminologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

4.5.1 Obtenção da Linhagem de *S. mansoni*

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH (oriunda de Belo Horizonte, MG), mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP em moluscos *B. glabrata* (hospedeiro intermediário) e *Mus musculus*, linhagem *Swiss* (hospedeiro definitivo).

4.5.2 Animais Hospedeiros

Os moluscos planorbídeos foram mantidos em tanques (50 L) e alimentados, diariamente, com folhas de alface frescas e ração para roedores triturada com adição de carbonato de cálcio 10% (SOUZA *et al.*, 1987), até que atingissem o tamanho ideal para poderem ser infectados (6 a 10 mm de diâmetro).

Para os ensaios *in vitro* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* e para os *in vivo*, camundongos isogêncios Balb/c. Foram utilizadas fêmeas, com 30 dias de idade e pesando aproximadamente 20 g. Ambas as linhagens de camundongos foram fornecidas pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampas metálicas e alimentados com ração autoclavada e água filtrada “*ad libitum*”. Os camundongos Balb/c foram mantidos em ambiente isolado (Estante Ventilada ALESCO). No manejo receberam maravalha autoclavada em duas trocas semanais.

4.5.3 Manutenção do Ciclo Evolutivo de *S. mansoni*

Para a infecção dos hospedeiros intermediários, foram utilizados dez miracídios (linhagem BH) obtidos pelo método da tamisação das fezes (coletaram-se fezes de camundongos, infectados há sessenta dias, dissolvendo-as na água e macerando-as; em seguida essas foram peneiradas utilizando-se malha de 100 e, posteriormente, de 400 micras).

O conteúdo adquirido com a tamisação foi concentrado em uma placa de Petri e exposto à luz e temperatura de 28 °C durante uma hora, para eclosão das larvas. Essas foram pipetadas, colocadas em frasco do tipo “snap-cap” juntamente com um único exemplar de *B. glabrata* - utilizando-se dez indivíduos por molusco - e expostas por duas horas ao calor e iluminação.

Em cada ciclo de infecção foram expostos oitenta moluscos para que fornecessem uma quantidade razoável de indivíduos positivos a fim de se obter equilíbrio entre os sexos do parasito no camundongo (PELLEGRINO & KATZ, 1968). Após o período de exposição, os planorbídeos foram mantidos em aquários de vidro (SOUZA *et al.*, 1987).

Decorridos 35 a 40 dias de infecção, os hospedeiros intermediários foram colocados em recipiente de vidro com água filtrada e declorada e submetidos a calor e iluminação por duas horas, a fim de eliminar cercárias. Essas foram recolhidas em placa de Petri, utilizando-se estereomicroscópio (20x), separadas e colocadas em tubos de ensaio.

Para a infecção dos hospedeiros definitivos foi utilizada a técnica de imersão caudal em suspensão cercariana, durante duas horas de exposição à luz e temperatura de 28 °C (OLIVIER & STIREWALT, 1952). Para conter os camundongos durante esse período, foram utilizados dispositivos de contenção de camundongos. As fêmeas de camundongos Balb/c e Swiss foram infectadas individualmente com setenta cercárias da linhagem BH.

Para cada ciclo de infecção foram utilizados 30 animais distribuídos em seis gaiolas, com cinco camundongos em cada uma. No final do processo o

conteúdo de cada tubo de ensaio, referente a cada camundongo, foi analisado para contar quantas cercárias não penetraram no animal.

4.6 Ensaio *In Vitro*

4.6.1 Obtenção dos Vermes Adultos

Para obtenção dos vermes adultos, foram infectados, previamente, camundongos *Swiss* com *S. mansoni*, linhagem BH, conforme o tópico 4.5.3. Após 60 dias de infecção, os animais foram eutanaziados, por deslocamento cervical, e os vermes adultos recolhidos através da perfusão do sistema porta-hepático (YOLLES *et al.*, 1947). Com o uso de esteromicroscópio (10x) os casais de vermes foram selecionados, em seguida, lavados em solução estéril de NaCl 0,9% e posteriormente em meio de cultura RPMI 1640, esterilizado por filtração, acrescido de penicilina/estreptomicina 0,01%.

4.6.2 Grupos Experimentais

O OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina, em diferentes concentrações, foram aplicados em 5 réplicas (tabela 4), diretamente sobre o meio de cultura onde estavam os casais de *S. mansoni*, para avaliação de seu efeito na viabilidade dos vermes.

Foram testadas 4 diferentes concentrações dessas amostras: 400 (C1); 200 (C2); 100 (C3) e 50 (C4) µg/mL, distribuídas aleatoriamente na placa de cultura. Essas mesmas concentrações também foram utilizadas para analisar a ação do PZQ sobre os mesmo parâmetros.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4. Distribuição dos grupos experimentais na placa de cultura (24 poços).

Poços	1	2	3	4	5	6
A	C1: 400 µg/mL	C1: 400 µg/mL	C3: 100 µg/mL	C2: 200 µg/mL	C4: 50 µg/mL	C2: 200 µg/mL
B	C4: 50 µg/mL	C1: 400 µg/mL	C3: 100 µg/mL	C2: 200 µg/mL	C3: 100 µg/mL	C3: 100 µg/mL
C	CONTROLE	C4: 50 µg/mL	CONTROLE	C1: 400 µg/mL	C2: 200 µg/mL	CONTROLE
D	C2: 200 µg/mL	C3: 100 µg/mL	C4: 50 µg/mL	C1: 400 µg/mL	CONTROLE	C4: 50 µg/mL

C1 – concentração de 400 µg/mL, C2 – 200 µg/mL, C3 – 100 µg/mL, C4 50 µg/mL, CONTROLE – Grupo sem adição de extratos, frações, composto ou fármaco.

Em cada poço foram acrescentados, além das concentrações dos extratos a serem testadas, 2 mL do meio de cultura e 1 casal de *S. mansoni*. Durante o período de observação, as placas de cultura foram mantidas em estufa de CO₂ à 37 °C. O grupo controle foi mantido sob as mesmas condições, porém sem a adição de extratos, frações, composto ou fármaco.

A viabilidade dos vermes foi avaliada em intervalos de tempo crescentes e regulares (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h, 48h e 72h), após a adição das amostras. A figura 7 mostra o esquema experimental dos testes *in vitro*.

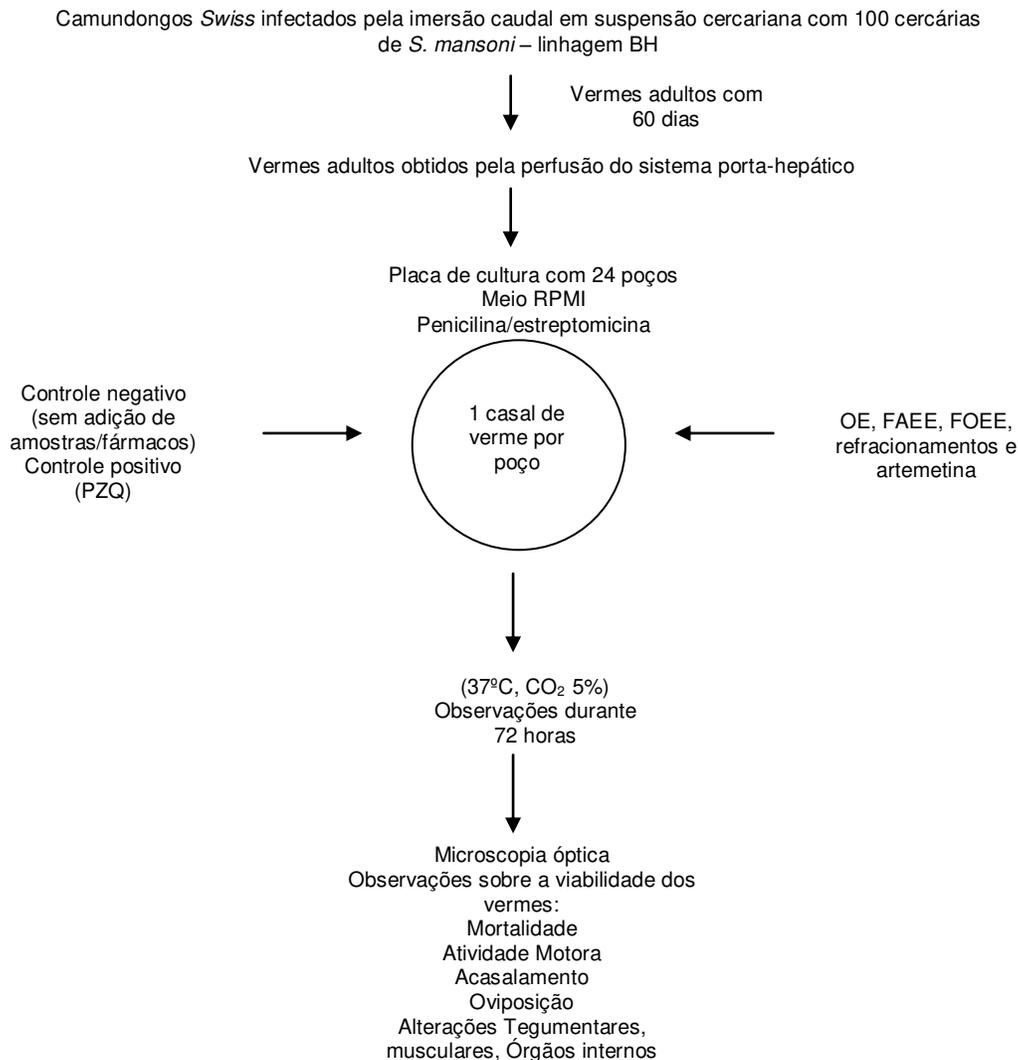


Figura 7. Esquema experimental dos ensaios *in vitro*. Adaptado de MORAES, 2011a.

4.6.3 Avaliação dos grupos experimentais

A avaliação do efeito do extrato aquoso, óleo essencial, fração orgânica, refracionamentos e artemetina, além do PZQ, foi feita utilizando-se microscópio invertido (100x). Foram analisadas as possíveis alterações (BARKER *et al.*, 1966; TOMOSKY *et al.*, 1974; Da-SILVA e NOEL, 1995; MENDONÇA-SILVA *et al.*, 2002; BECKMANN & GREVELDING, 2010; MORAES, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2011):

a. Na atividade motora

- atribuiu-se “+++” para movimento intenso, ou seja, quando havia rápidos encurtamento e prolongamento do corpo, movimentos ondulatórios e ondas peristálticas propagadas ao longo do corpo, no eixo anterior/posterior que causavam deslocamento global do verme;

- atribuiu-se “++” para movimento intermediário e “+” para pouco movimento, ou seja, quando o movimento ondulatório do corpo do parasito (parcial ou de uma extremidade a outra) era apenas superficial, não sendo suficiente para levar o verme ao deslocamento;

- atribuiu-se “-” para os mortos, ou seja, aqueles que apresentavam total imobilidade;

- as reduções na movimentação foram consideradas leves (“++”) e significativas (entre “+” e “-”);

b. Na contração muscular

- considerou-se que os vermes apresentavam-se contraídos quando havia encurtamento do corpo, seguida de diminuição significativa da movimentação;

c. No tegumento

- considerou-se que o tegumento estava alterado quando houve ruptura deste ou destruição de tubérculos nos vermes machos e “peeling” nas fêmeas;

d. Nas estruturas internas

- considerou-se que as estruturas internas estavam alteradas quando havia protuberâncias localizadas posteriormente ao ovário das fêmeas (conforme descrito por Beckmann & Grevelding, 2010, e mostrado na figura 8).



Figura 8. Alteração em órgãos internos exibidas pela fêmea adulta de *S. mansoni*, durante teste *in vitro*. Foto: Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira.

e. No acasalamento

- através da separação dos casais;

f. Na oviposição

- através de reduções ou aumento da postura dos ovos no decorrer do experimento;

g. Na sobrevivência

- através da porcentagem de vermes mortos com o término do experimento.

As vantagens de se analisar visualmente (por microscopia) as alterações na viabilidade dos vermes são, segundo Noël (2008), o baixo custo, a facilidade de observação além da riqueza das informações que podem ser obtidas.

4.6.4 Cálculo das DLs 50 e 90

As DLs 50 e/ou 90 do OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina foram calculadas por meio do programa Origin 7.

4.7 Ensaio *in vivo*

4.7.1 Tratamento dos Camundongos

Os animais foram tratados por via oral, por meio de gavagem (DELGADO *et al.*, 1992), com as amostras que apresentaram melhor ação sobre os vermes nos ensaios "*in vitro*". Uma hora antes do tratamento a ração foi retirada para facilitar a gavagem.

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos (um deles recebeu tratamento após 45 dias de infecção e o outro após 60) sendo que em cada grupo, dez animais receberam uma determinada concentração do extrato ou da fração a ser testada (grupo teste); para os outros dez a mesma concentração, dessa vez com PZQ e para os dez restantes, Tampão PBS (grupo controle). Foram administrados 0,3 mL de cada solução do fármaco por animal. Para tratamentos feitos aos 45 dias de infecção, foram testadas as concentrações de 40, 100, 200 e 300 mg/kg e, aos 60 dias, de 40 e 200 mg/kg. A figura 9 mostra o esquema de tratamento dos camundongos.

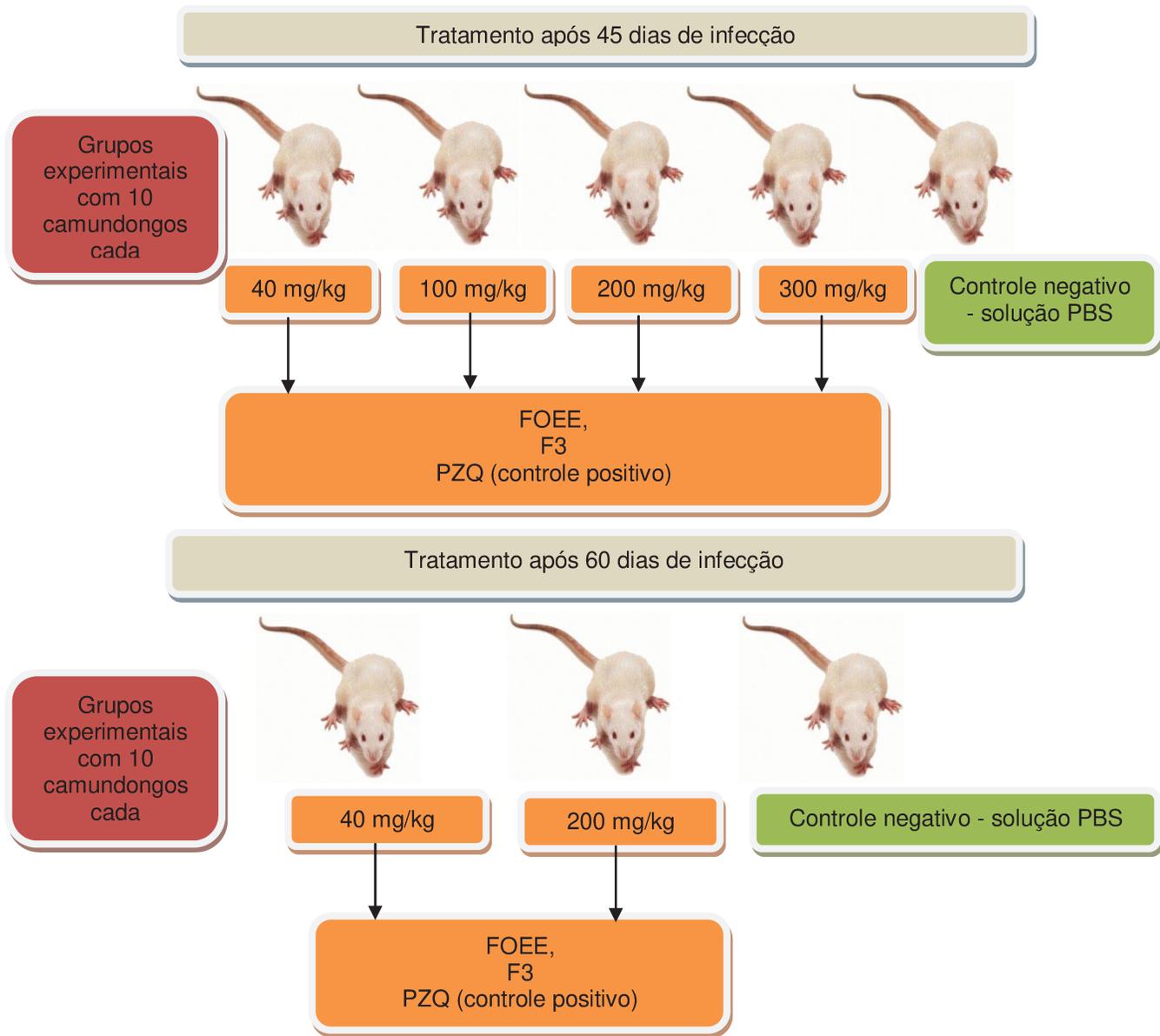


Figura 9. Esquema experimental de tratamento dos camundongos Balb/c.

4.7.2 Análise do Tratamento

Depois de 15 dias de efetuado o tratamento, período correspondente à eliminação dos parasitos, os camundongos foram eutanaziados por deslocamento cervical e os vermes coletados pela perfusão do sistema porta-hepático (YOLLES *et al.*, 1947). Foram contados os números de machos, fêmeas e casais encontrados.

Parte do fígado e do pulmão foi comprimida entre placas de vidro para verificar o deslocamento do verme do sistema porta-hepático para outros locais.

Do intestino grosso foram retirados fragmentos para realização do oograma (os fragmentos de 1 cm foram retirados da região do cólon ascendente; para tanto, contou-se 3 cm a partir do ceco - quadrante ilíaco direito - retirando sempre a mesma porção do intestino para todos os camundongos) e tiveram contados os ovos nos seus diferentes estágios de maturidade (1º a 5º estágio e ovos mortos), a fim de saber se o extrato e a fração interferiram na viabilidade dos mesmos (HERMETO *et al.*, 1994). Para tanto, foram analisados 10 campos aleatórios, no microscópio óptico com o aumento de 100 vezes. A classificação dos estágios de desenvolvimento seguiu o critério proposto por Pellegrino *et al.* (1962).

As fezes dos camundongos também foram analisadas, após 15 dias de tratamento, utilizando-se o método quantitativo de Kato & Miura (1954) modificado por Katz *et al.* (1972) para a contagem de ovos.

Para analisar se houve ganho de peso do grupo tratado em relação ao grupo controle positivo e animais sadios ou grupo controle negativo, não infectados (eutanaziados com a mesma idade dos outros animais) os camundongos foram pesados. O fígado e o baço também foram pesados para analisar a hepatoesplenomegalia em comparação ao grupo controle positivo.

Todos os procedimentos acima relatados foram também realizados para os grupos de animais controle positivo, ou seja, aqueles que receberam somente Tampão PBS.

4.7.3 Observações Histológicas

Foram retirados fragmentos do fígado (lobo caudal), intestino (mesma região usada na confecção dos granulomas), baço (metade inferior) e pulmão direito, posteriormente fixados em formol 10%. Foram escolhidos aleatoriamente três camundongos para terem seus órgãos analisados histologicamente, correspondente a cada tratamento e concentração.

A coloração foi feita pela Hematoxilina de Ehrlich e Eosina Y 0,5% e a espessura dos cortes foi de 5 µm. Os granulomas foram medidos e contados com o auxílio do programa “Image Manager 50”, contando-se os granulomas presentes em aproximadamente 1cm².

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras que apresentaram melhor atividade nos testes *in vitro* e *in vivo* tiveram analisadas sua ação no tegumento de *S. mansoni*.

Para tanto, foram feitos testes *in vivo* com essas amostras, utilizando a concentração de 300 mg/kg. Os procedimentos de infecção, tratamento (feito após 45 dias de infecção) e obtenção dos vermes adultos foram feitos conforme os tópicos 3.2.3, 3.4.2 e 3.3.1, respectivamente.

Os vermes recuperados do sistema porta-hepático dos camundongos Balb/c, foram lavados em solução estéril de NaCl 0,9%. Em seguida, foram fixados por 24 horas em glutaraldeído 2,5%, tamponado em pH 7,2 com solução de cacodilato de sódio 0,1M. Posteriormente o material foi lavado durante 2 horas com essa mesma solução tampão, trocando-a a cada 10 minutos. Após a lavagem, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas, ao abrigo da luz. Novamente, o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio durante 1 hora, trocando a solução a cada 30 minutos. A desidratação foi feita em série crescente (50% - 70% - 80% - 95% - 100%) de solução de etanol durante 30 minutos para cada série e secas em câmara de ponto crítico Balzers, modelo CPD 30.

As amostras já secas foram montadas sobre ‘stubs’ de alumínio e cobertas com uma fina camada (aproximadamente 20 nm) de ouro no sputter coater Bal-Tec/Balzers modelo SCD 50. O material foi analisado em Ultramicroscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5800LV.

4.9 Comitê de Ética

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Unicamp (CEE-Unicamp), sob protocolo nº 1899-1,

por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.10 Análises Gráficas e Estatísticas

As análises gráficas e estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Excel versão 2007 (Microsoft) e Bioestat versão 5.0.

A comparação entre os conjuntos experimentais nos testes *in vitro* e *in vivo* foram feitos com os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, considerando significativas as diferenças com $p < 0,05$. Para o parâmetro "área" dos granulomas foi realizada a análise de variância (ANOVA) e Tukey, também com índice de probabilidade de $p < 0,05$.

Nos testes *in vivo*, as porcentagens de eficiência para vermes (redução de vermes) e ovos (redução de ovos) foram obtidas por meio da fórmula: Redução de Vermes ou Redução de Ovos = $(\text{vermes ou ovos no grupo controle} - \text{vermes ou ovos no grupo teste}) / (\text{vermes ou ovos no grupo controle}) \times 100$. A Razão Relativa ao Sexo (R.R.S.) foi obtida da seguinte forma: $\text{R.R.S.} = (\text{vermes machos/fêmeas no grupo teste}) / (\text{vermes machos/fêmeas no grupo controle})$. A porcentagem de fuga dos vermes para o fígado foi calculada por: $\text{Fuga para o Fígado} = (\text{número de vermes no fígado} / \text{total de vermes}) \times 100$ (DELGADO *et al.*, 1992).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Estudos Fitoquímicos

A figura 10, presente na próxima página, mostra o esquema de obtenção do EE a partir do resíduo das folhas de *C. verbenacea*, bem como das FAEE, FOEE e seus refrações (F1-2; F3; F4-5; F3.5; F6; F3.7-3.9), além dos rendimentos das amostras utilizadas nos ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

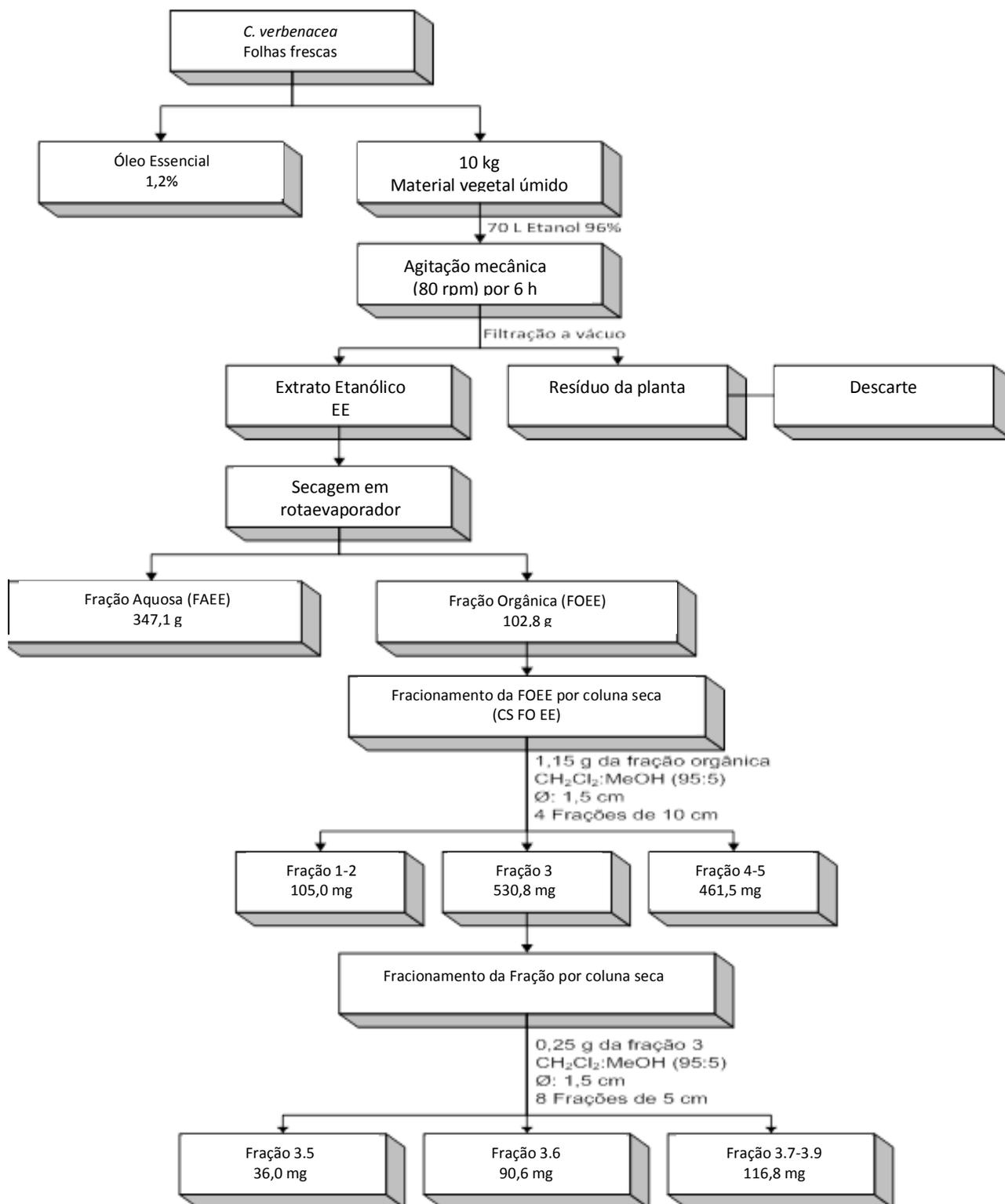


Figura 10. Obtenção e rendimento (mg) das amostras de *C. verbenacea*.

O EE e as FAEE e FOEE foram analisados por CCD, conforme mostra a figura 11.

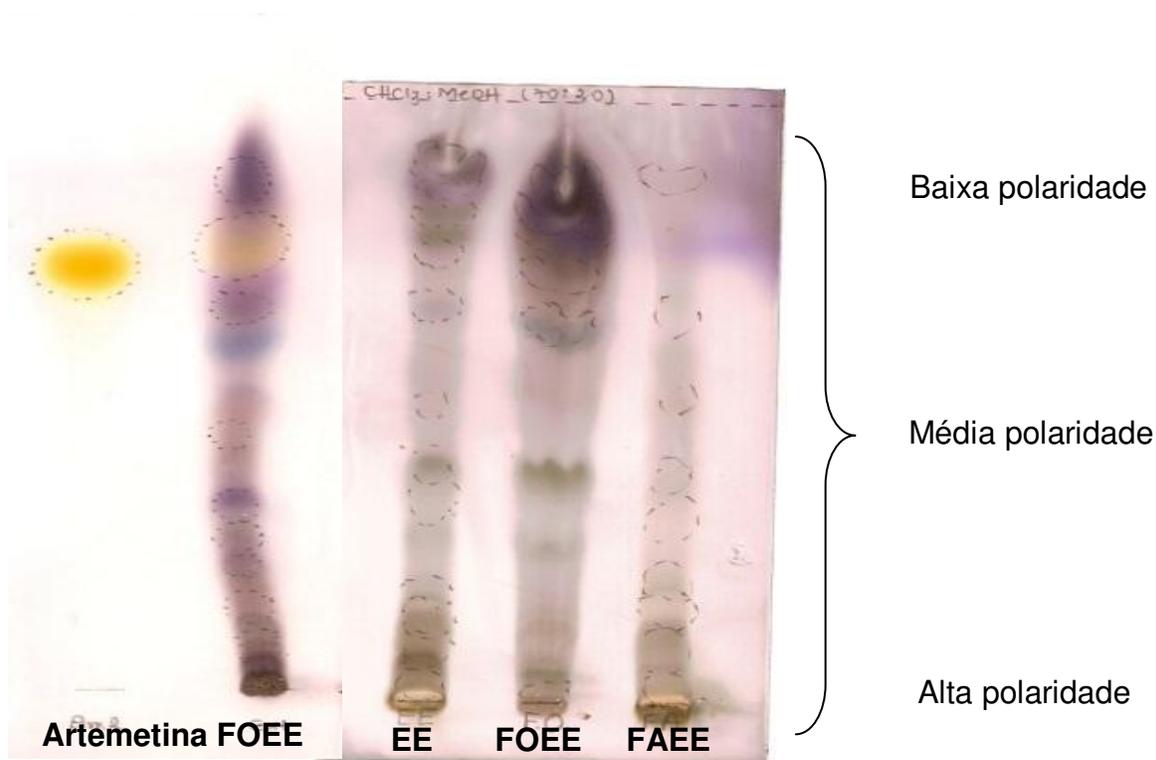


Figura 11: CCD do EE e das FOEE e FAEE. Eluente: CHCl_3 :MeOH (70:30v/v). Visualização em luz UV (254 e 366 nm). Revelador: solução de anisaldeído.

O EE e as FAEE e FOEE foram analisados por CG-EM, porém esta técnica mostrou-se inadequada para análise dessas amostras devido a presença de compostos de alta polaridade. Sendo assim, o monitoramento do fracionamento químico foi feito somente por CCD. As FAEE e FOEE, além do OE, foram submetidas aos ensaios de atividade anti-*S. mansoni*, *in vitro*, e a FOEE foi selecionada para dar continuidade aos estudos químicos.

A FOEE foi fracionada em coluna seca, fornecendo três frações: F1-2, F3 e F4-5. Foi feita a análise por CCD utilizando o eluente CHCl_3 :MeOH (95:05 v/v) o que permitiu uma melhor separação das substâncias na placa, como pode ser visto na figura 12.

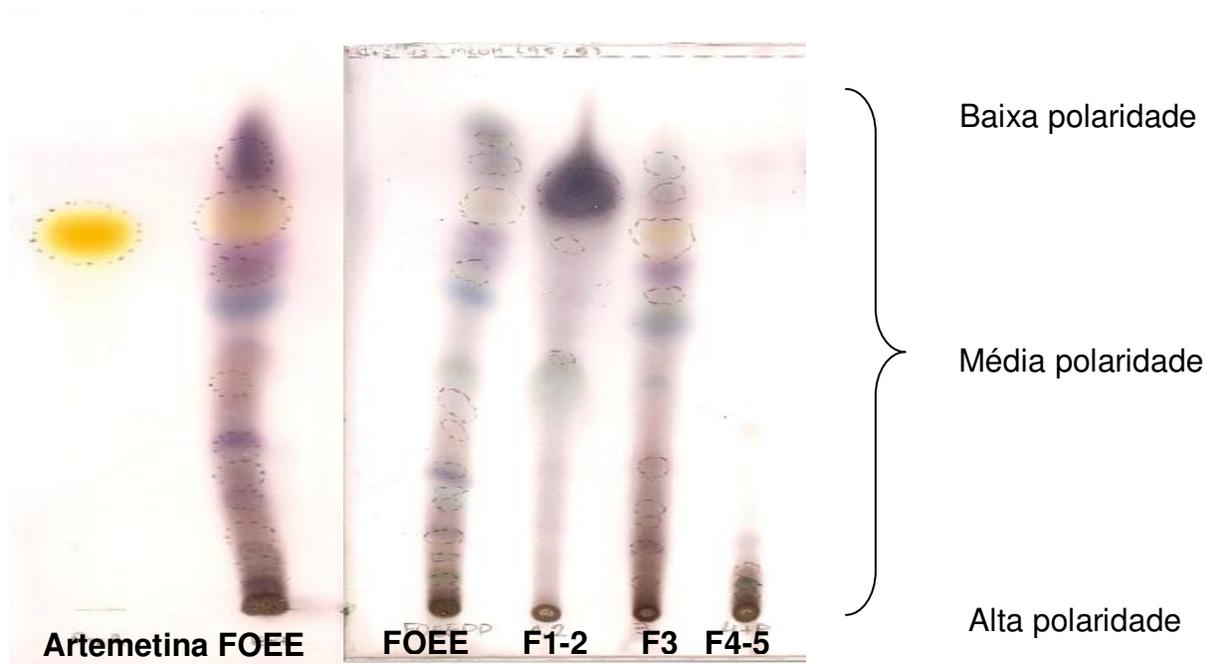


Figura 12: CCD da FOEE e das frações da coluna seca: F1-2, F3 e F4-5. Eluente: CHCl_3 :MeOH (95:05v/v). Visualização em luz UV (254 e 366 nm). Revelador: solução de anisaldeído.

As F1-2, F3 e F4-5 foram submetidas aos ensaios de atividade anti-*S. mansoni*, *in vitro*, e a F3 foi selecionada para dar continuidade aos estudos químicos. Sendo assim, a F3 foi refractionada em coluna seca, obtendo-se as três frações: F3.5, F3.6 e F3.7-3.9, que foram analisadas por CCD (figura 13).

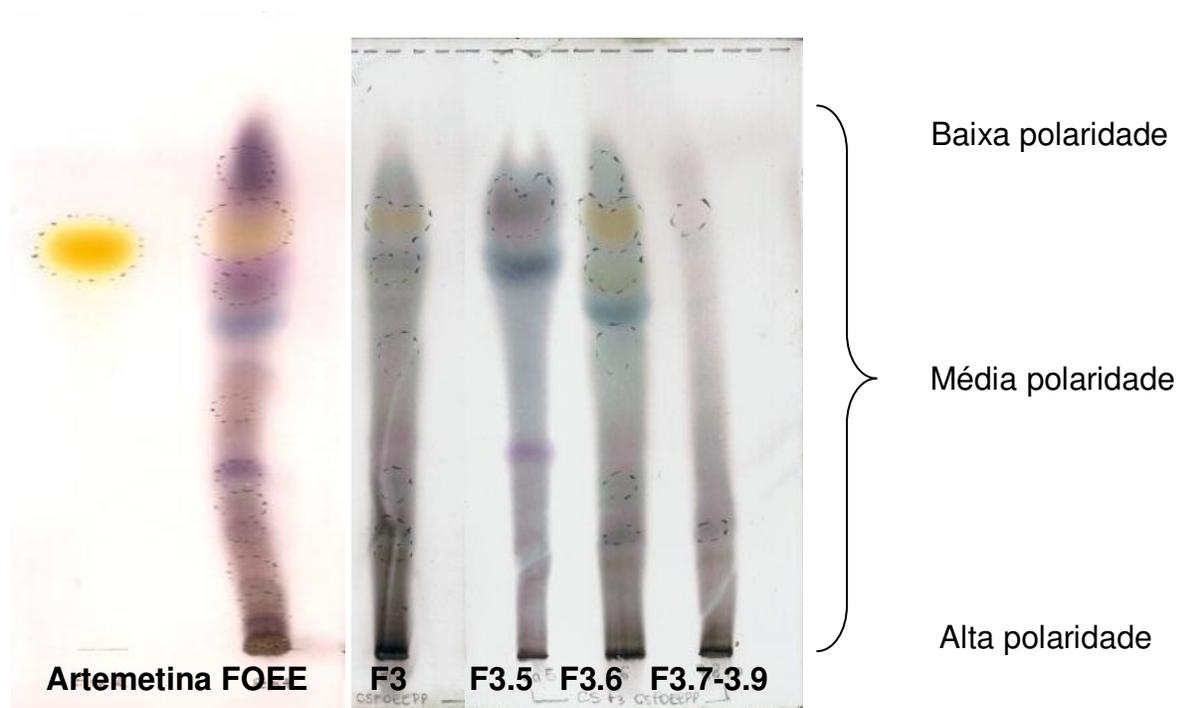


Figura 13: CCD das F3, F3.5, F3.6 e F3.7-3.9. Eluente: CHCl_3 :MeOH (95:05v/v). Visualização em luz UV (254 e 366 nm). Revelador: solução de anisaldeído.

A artemetina (figura 14), isolada anteriormente em outros estudos efetuados no CPQBA, foi comparada por CCD com a FOEE (figura 10) onde foi possível confirmar sua presença na FOEE. As F3 e F3.6 também apresentam a artemetina em sua composição (figuras 12 e 13). Sendo assim, esta substância foi também encaminhada aos ensaios de atividades anti-*S. mansoni*, *in vitro*.

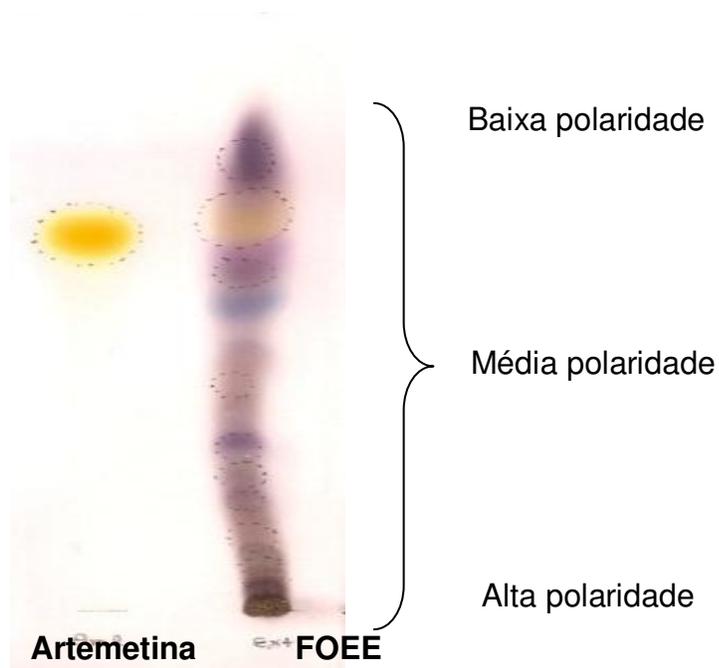


Figura 14: CCD da artemetina isolada e da FOEE. Eluente: CHCl_3 :MeOH (95:05v/v). Visualização em luz UV (254 e 366 nm). Revelador: solução de anisaldeído

5.2 Ensaio *in vitro*

5.2.2 Sobrevida de adultos de *S. mansoni* em presença de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*

A mortalidade dos adultos de *S. mansoni* foi monitorada durante as cinco primeiras horas após a adição da amostra testada e depois, a cada 24 horas até completar 72 horas de observação. Verificou-se que a morte dos vermes foi diretamente dependente da concentração administrada.

Todas as amostras provocaram a morte dos vermes, porém em diferentes porcentagens. Taxas de mortalidades mais altas foram observadas para a FOEE, em comparação à FAEE e OE. Por essa razão, foi submetida ao fracionamento e, deste, as F3 e F4-5 apresentaram atividades parecidas em relação a mortalidade, porém a 3 mostrou-se mais ativa, principalmente nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Além disso, atividade esquistossomicida parecida com a obtida pelo praziquantel (PZQ - grupo controle positivo) foi observada para essa fração. Dessa forma, a F3 foi refraçada.

Das frações obtidas pelo refraçamento da F3, a F3.7-3.9 demonstrou-se mais ativa que as outras oriundas desse, porém, apresentou-se menos ativa que as FOEE e F3.

Foi possível analisar que a medida em que efetuou-se o refraçamento da F3, a atividade esquistossomicida das amostras foram decrescendo, principalmente nas concentrações mais baixas (50 e 100 µg/mL) como mostra a tabela 5. Em relação ao grupo controle negativo (sem adição de amostras/fármacos) não foi observada mortalidade.

Tabela 5. Porcentagem de vermes mortos ao final do experimento com as amostras derivadas de *C. vebenacea*.

	Mortalidade (%)				
	0	50	100	200	400
	$\mu\text{g/mL}$				
OE		20	30	30	30
FAEE		10	20	30	30
FOEE		60	90	100	100
F1-2		10	20	20	70
F3		80	90	100	100
F4-5		70	80	100	100
F3.5		20	20	20	80
F3.6		50	60	80	100
F3.7-3.9		60	80	90	100
Artemetina		40	40	60	90
PZQ		90	90	100	100
Controle negativo*	-				
**DMSO 0,05%	-				

Em negrito: amostras que apresentaram maior atividade esquistossomicida.*Controle negativo - sem adição de amostras/fármacos. **DMSO 0,05% - Controle feito com DMSO 0,05%

Nem todas as amostras testadas apresentaram ação esquistossomicida para 100% dos vermes, caso do FAEE, OE, F1-2, F3.5 e do composto artemetina que apresentaram mortalidade, respectivamente, de até 30, 70, 80 e 90% com a maior concentração (400 $\mu\text{g/mL}$).

O tempo em que houve 100% de mortalidade para os vermes também variou conforme a amostra. Com exceção da F3.6, todas as outras apresentaram tempo de ação esquistossomicida parecidos ou superiores ao PZQ, como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6. Amostras derivadas de *C. verbenacea* que apresentaram ação esquistossomicida para 100% dos vermes em relação ao tempo.

	Tempo de 100% de mortalidade (horas)			
	50	100	200	400
	µg/mL			
FOEE	-	-	48 hs	48 hs
F3	-	-	72 hs	24 hs
F4-5	-	-	48 hs	24 hs
F3.6	-	-	-	72 hs
F3.7-3.9	-	-	-	48 hs
PZQ	-	-	72 hs	48 hs

F3 e F4-5 - obtidas do fracionamento da FOEE; F3.6 e F3.7-3.9 - obtidas do refração da F3.

Em relação à mortalidade de machos e fêmeas foi observado que em todas as amostras testadas, principalmente com concentrações mais baixas (100 a 50 µg/mL), houve ação preferencial pelos vermes machos como pode ser visto nas figuras 15 a 17. Ensaios feitos com o PZQ obtiveram-se esse mesmo resultado, conforme mostra a figura 18.

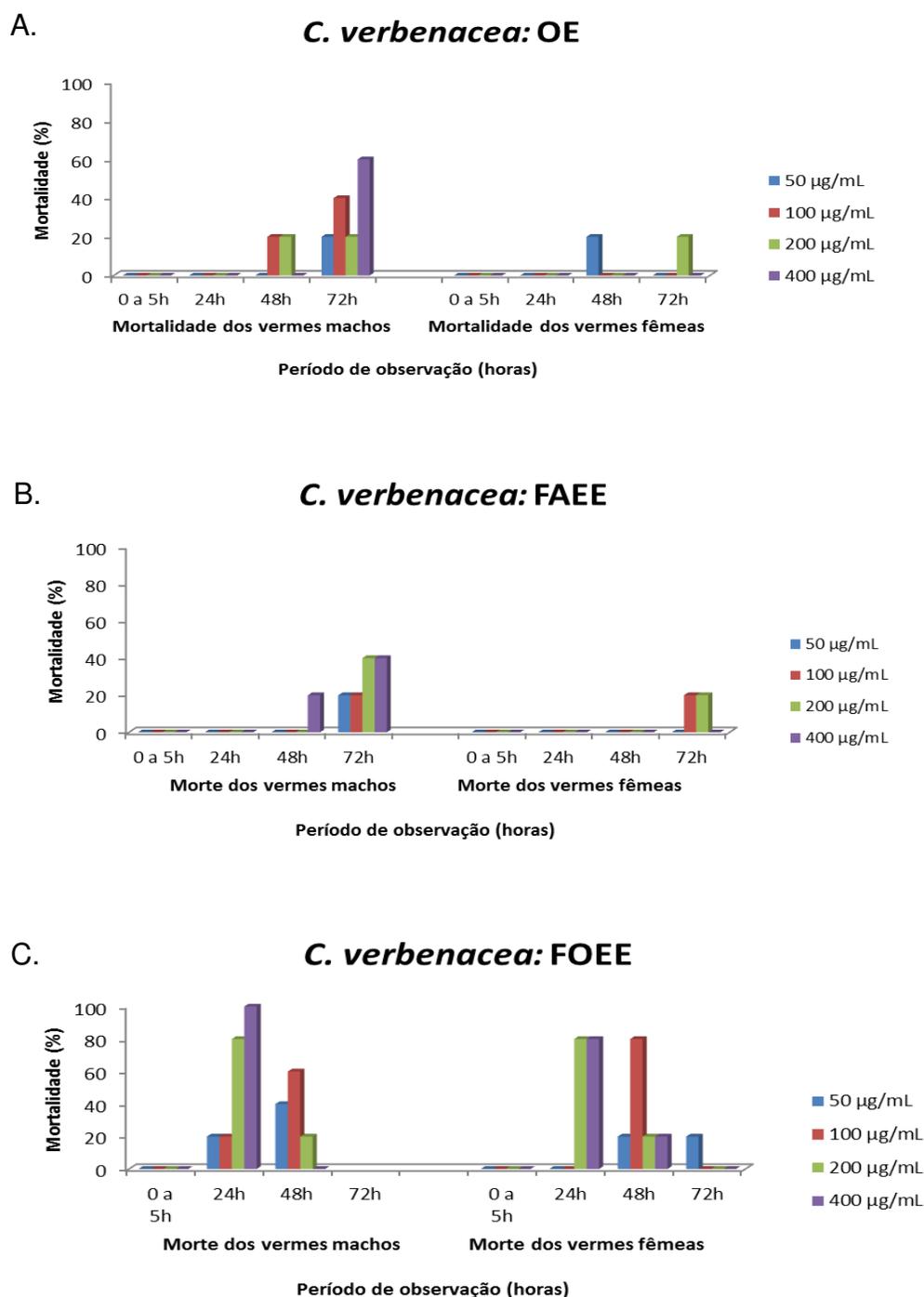


Figura 15. (A) (B) e (C): Ação de OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina extraídos de *C.verbenacea* sobre a mortalidade de adultos de *S. mansoni*, machos e fêmeas, em relação ao período de observação. Não houve mortalidade para os grupos controles negativo (sem adição de amostras/fármacos).

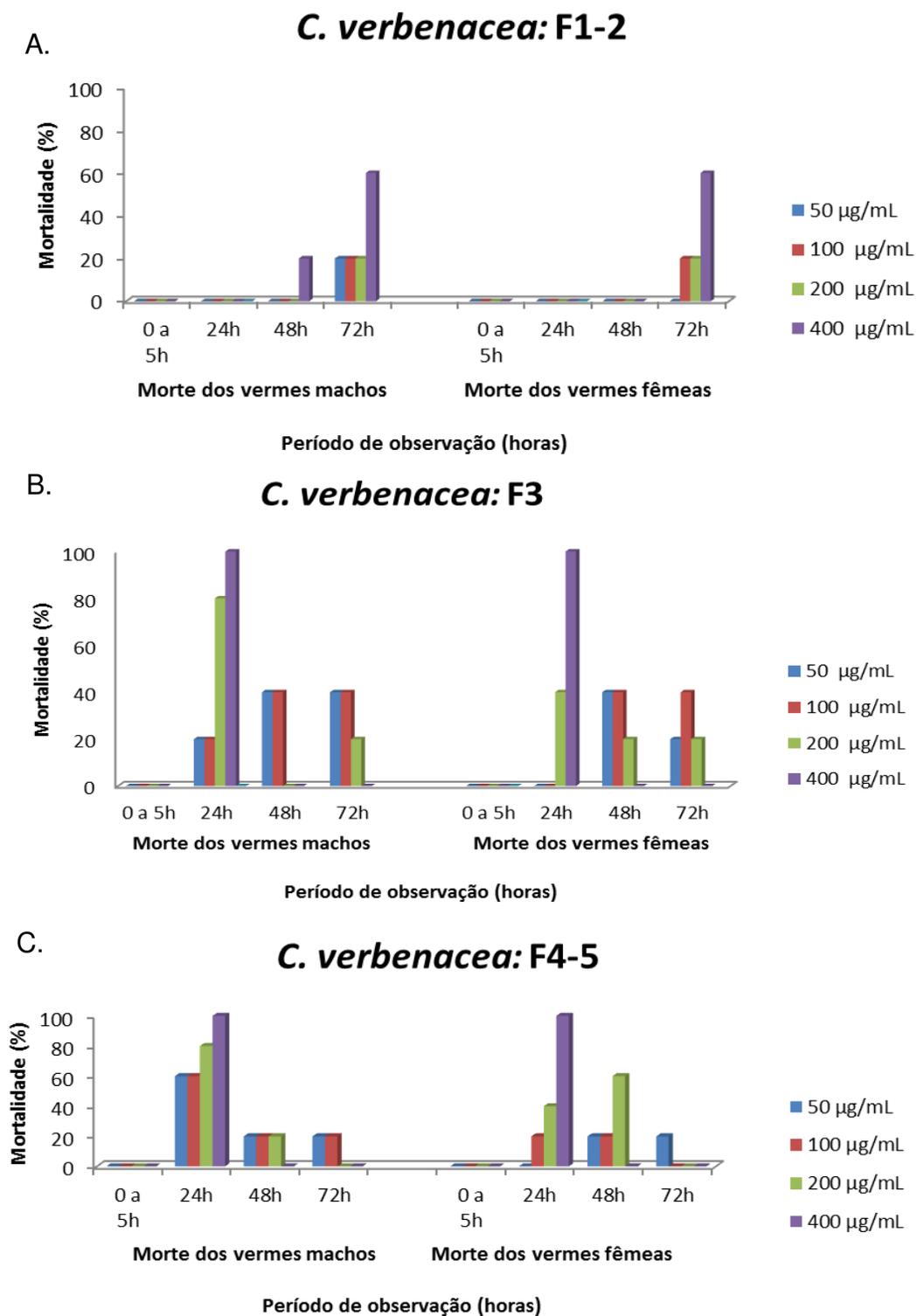


Figura 16. (A) (B) e (C): Ação das F1-2, F3 e F4-5, obtidas do fracionamento da FOEE de *C. verbenacea*, sobre a mortalidade de adultos de *S. mansoni*, machos e fêmeas, em relação ao período de observação. Não houve mortalidade para os grupos controles negativo (sem adição de amostras/fármacos).

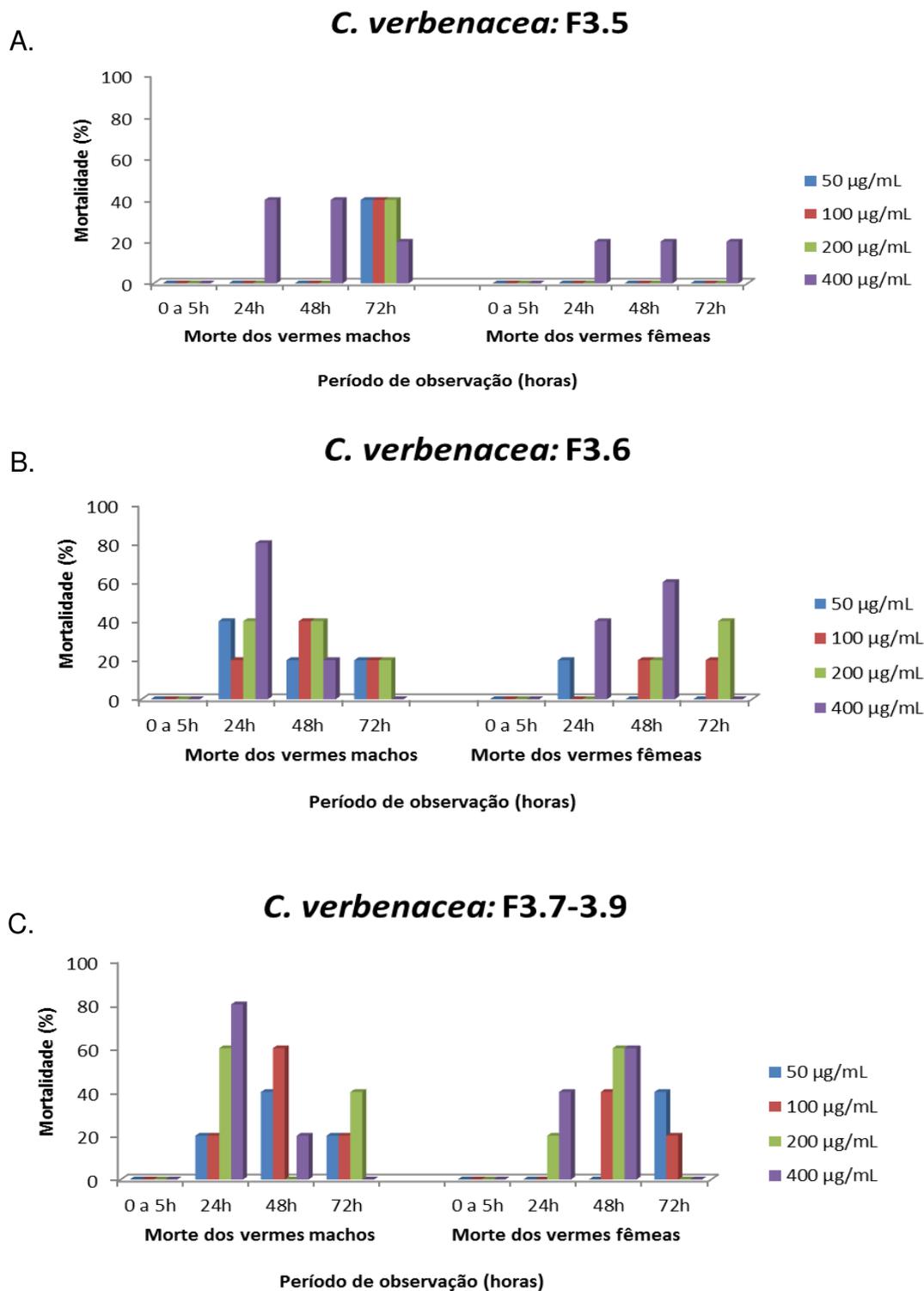


Figura 17. (A) (B) e (C): Ação das F3.5, F3.6 e F3.7-3.9, obtidas do refracionamento da F3, sobre a mortalidade de adultos de *S. mansoni*, machos e fêmeas, em relação ao período de observação. Não houve mortalidade para os grupos controles negativo (sem adição de amostras/fármacos).

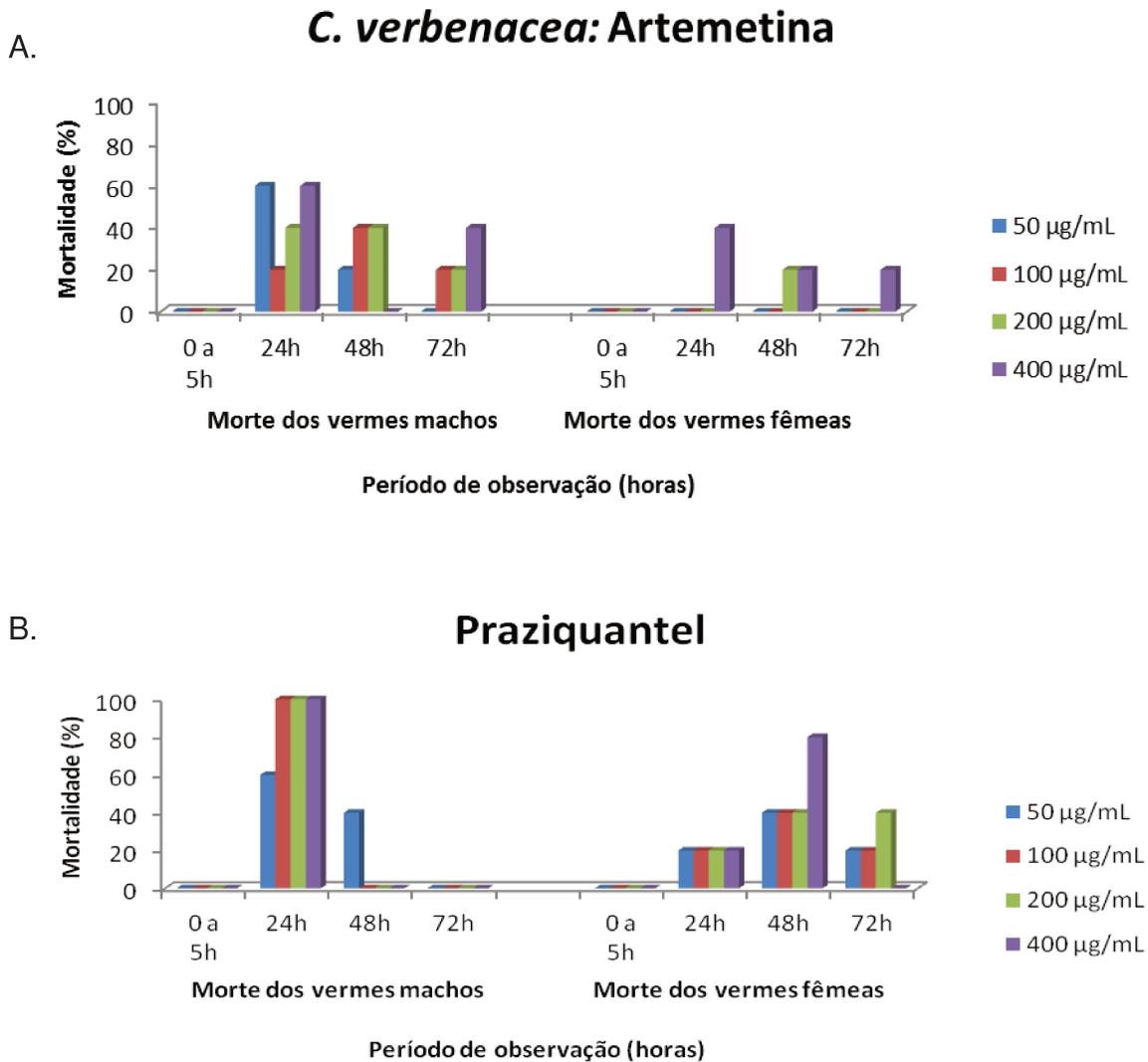


Figura 18. (A) e (B): Ação da artemetina e do PZQ sobre a mortalidade de adultos de *S. mansoni*, machos e fêmeas, em relação ao período de observação. Não houve mortalidade para os grupos controles negativo (sem adição de amostras/fármacos).

5.2.3 Efeito de OE, FAEE FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, na atividade motora e acasalamento de adultos de *S. mansoni*

Todas as amostras testadas causaram alterações na atividade motora do parasito. A porcentagem total de vermes que sofreram reduções na atividade motora, leves ou significativas, foi diretamente proporcional à concentração testada e ao tempo de observação, como pode ser visto nas tabelas 7 a 16.

Reduções significativas na atividade motora de até 100% foram observadas para as FOEE, F3 e F4-5 com as concentrações de 200 e 400 µg/mL; 3.5 com a concentração de 400 µg/mL, F3.6 e F3.7-3.9 com as concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL. Apesar dessas duas últimas frações terem apresentado até 100% de redução na atividade motora para a concentração de 100 µg/mL, essas não foram suficientes para provocar a morte de todos os vermes.

O grupo controle negativo (sem adição de amostras/fármacos) não sofreu alterações na motilidade. O grupo controle DMSO 0,05% apresentou redução leve na atividade motora para 75% dos vermes (tabela 18), contudo, não foi suficiente para provocar mortalidade. O grupo controle positivo (com adição de PZQ) apresentou reduções significativas na movimentação para 100% dos vermes em todas as concentrações testadas (tabela 17), porém essas estão relacionadas à morte de todos os vermes somente com as concentrações de 200 e 400 µg/mL. De todas as amostras testadas, a F3 foi a que se mais se aproximou do resultado observado para o PZQ (80 e 90% de alterações significativas com as concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente, e 100% para as concentrações de 200 e 400 µg/mL).

As amostras também tiveram ação sobre o acasalamento dos vermes. Ao término dos experimentos a porcentagem de vermes separados foi superior a do grupo controle negativo e DMSO 0,05% (em ambos houve 50% de separações em 72 horas), para todas as concentrações (tabelas 7 a 16 e 18), com exceção da de 50 µg/mL de FAEE e OE, que tiveram porcentagem de casais separados iguais ao do grupo controle.

O grupo controle positivo apresentou menos casais separados (20%), em relação ao grupo controle negativo, com as concentrações de 200 e 400 µg/mL (tabela 17).

RESULTADOS

Tabela 7. Efeito do OE de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

OE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	20,0	30,0	50,0
	48	10,0		50,0	30,0	60,0	90,0
	72	10,0	20,0	50,0	30,0	60,0	90,0
100	1	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		80,0	50,0	20,0	70,0
	48	10,0		80,0	80,0	20,0	100,0
	72	20,0	30,0	80,0	70,0	30,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		40,0	60,0	30,0	90,0
	48	10,0		100,0	70,0	30,0	100,0
	72	20,0	30,0	100,0	70,0	30,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		80,0	60,0	30,0	90,0
	48	10,0		100,0	70,0	30,0	100,0
	72	20,0	30,0	100,0	70,0	30,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ****Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; ***** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

Tabela 8. Efeito do FAEE de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

FAEE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total***		Leve	Significativa	Total**
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		20,0	20,0	0,0	20,0
	4	0,0		20,0	20,0	0,0	20,0
	5	0,0		20,0	20,0	0,0	20,0
	24	0,0		50,0	40,0	20,0	60,0
	48	0,0		50,0	40,0	20,0	60,0
	72	10,0	10,0	50,0	40,0	20,0	60,0
100	1	0,0		80,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		80,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		80,0	30,0	0,0	30,0
	4	0,0		80,0	30,0	0,0	30,0
	5	0,0		80,0	30,0	10,0	40,0
	24	0,0		100,0	50,0	50,0	100,0
	48	0,0		100,0	50,0	50,0	100,0
	72	20,0	20,0	100,0	50,0	50,0	100,0
200	1	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	20,0	0,0	20,0
	3	0,0		80,0	20,0	0,0	20,0
	4	0,0		80,0	20,0	0,0	20,0
	5	0,0		80,0	30,0	0,0	30,0
	24	0,0		100,0	60,0	40,0	100,0
	48	0,0		100,0	60,0	40,0	100,0
	72	30,0	30,0	100,0	60,0	40,0	100,0
400	1	0,0		20,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		20,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		80,0	40,0	0,0	40,0
	4	0,0		80,0	40,0	0,0	40,0
	5	0,0		75,0	40,0	10,0	50,0
	24	0,0		100,0	40,0	60,0	100,0
	48	20,0		100,0	40,0	60,0	100,0
	72	10,0	30,0	100,0	40,0	60,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

Tabela 9. Efeito da FOEE de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

FOEE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	20,0	0,0	20,0
	3	0,0		60,0	20,0	0,0	20,0
	4	0,0		60,0	20,0	0,0	20,0
	5	0,0		60,0	20,0	0,0	20,0
	24	10,0		80,0	60,0	20,0	80,0
	48	40,0		80,0	60,0	40,0	100,0
	72	20,0	60,0	80,0	40,0	60,0	100,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	40,0	40,0	40,0
	3	0,0		60,0	40,0	40,0	40,0
	4	0,0		60,0	40,0	40,0	40,0
	5	0,0		60,0	40,0	40,0	40,0
	24	10,0		60,0	70,0	30,0	100,0
	48	70,0		70,0	70,0	30,0	100,0
	72	10,0	90,0	100,0	10,0	90,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	30,0	0,0	30,0
	3	0,0		60,0	30,0	20,0	50,0
	4	0,0		60,0	30,0	20,0	50,0
	5	0,0		60,0	30,0	20,0	50,0
	24	80,0		100,0	20,0	80,0	100,0
	48	20,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	50,0	0,0	50,0
	3	0,0		100,0	50,0	30,0	80,0
	4	0,0		100,0	50,0	30,0	80,0
	5	0,0		100,0	50,0	30,0	80,0
	24	100,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	0,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

Tabela 10. Efeito da F1-2 (obtida pelo fracionamento da FOEE) de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F1-2 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		60,0	10,0	0,0	10,0
	4	0,0		60,0	10,0	0,0	10,0
	5	0,0		60,0	10,0	0,0	10,0
	24	0,0		60,0	10,0	10,0	20,0
	48	0,0		60,0	10,0	10,0	20,0
	72	10,0	10,0	60,0	10,0	30,0	40,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		60,0	10,0	0,0	10,0
	4	0,0		60,0	10,0	0,0	10,0
	5	0,0		60,0	20,0	0,0	20,0
	24	0,0		60,0	30,0	10,0	40,0
	48	0,0		60,0	50,0	10,0	60,0
	72	20,0	20,0	60,0	50,0	20,0	70,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	50,0	0,0	50,0
	3	0,0		60,0	50,0	0,0	50,0
	4	0,0		60,0	50,0	0,0	50,0
	5	0,0		60,0	50,0	0,0	50,0
	24	0,0		60,0	80,0	10,0	90,0
	48	0,0		60,0	80,0	20,0	100,0
	72	20,0	20,0	60,0	80,0	20,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	40,0	0,0	40,0
	3	0,0		80,0	40,0	0,0	40,0
	4	0,0		80,0	40,0	0,0	40,0
	5	0,0		80,0	40,0	0,0	40,0
	24	0,0		80,0	40,0	10,0	50,0
	48	10,0		100,0	40,0	60,0	100,0
	72	60,0	70,0	100,0	30,0	70,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 11. Efeito da F3 (obtida pelo fracionamento da FOEE) sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F 3 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		100,0	10,0	0,0	10,0
	4	0,0		100,0	10,0	0,0	10,0
	5	0,0		100,0	20,0	0,0	20,0
	24	10,0		100,0	40,0	20,0	60,0
	48	40,0		100,0	60,0	40,0	100,0
	72	30,0	80,0	100,0	20,0	80,0	100,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		100,0	20,0	0,0	20,0
	5	0,0		100,0	30,0	0,0	30,0
	24	10,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	48	40,0		100,0	10,0	90,0	100,0
	72	40,0	90,0	100,0	10,0	90,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		100,0	20,0	0,0	20,0
	24	60,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	20,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		100,0	30,0	10,0	40,0
	4	0,0		100,0	50,0	10,0	60,0
	5	0,0		100,0	50,0	10,0	60,0
	24	100,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	0,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 12. Efeito da F4-5 (obtida pelo fracionamento da FOEE) de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F 4-5 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		60,0	0,0	0,0	0,0
	24	30,0		100,0	0,0	20,0	20,0
	48	20,0		100,0	0,0	50,0	50,0
	72	20,0	70,0	100,0	0,0	80,0	80,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		40,0	20,0	0,0	20,0
	4	0,0		40,0	20,0	0,0	20,0
	5	0,0		40,0	20,0	0,0	20,0
	24	40,0		100,0	30,0	50,0	80,0
	48	20,0		100,0	30,0	50,0	80,0
	72	20,0	80,0	100,0	20,0	80,0	90,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	10,0	0,0	10,0
	3	0,0		40,0	20,0	0,0	20,0
	4	0,0		40,0	30,0	0,0	30,0
	5	0,0		40,0	30,0	0,0	30,0
	24	60,0		100,0	0,0	80,0	80,0
	48	40,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		40,0	40,0	0,0	40,0
	4	0,0		40,0	50,0	0,0	50,0
	5	0,0		40,0	50,0	0,0	50,0
	24	100,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	0,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 13. Efeito da F3.5 (obtida pelo refracionamento da F 3) de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F 3.5 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	0,0	10,0	10,0
	3	0,0		60,0	0,0	10,0	10,0
	4	0,0		60,0	0,0	10,0	10,0
	5	0,0		60,0	0,0	10,0	10,0
	24	0,0		80,0	20,0	30,0	50,0
	48	0,0		100,0	20,0	30,0	50,0
	72	20,0	20,0	100,0	20,0	30,0	50,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	30,0	10,0	40,0
	3	0,0		40,0	30,0	10,0	40,0
	4	0,0		40,0	30,0	10,0	40,0
	5	0,0		40,0	30,0	10,0	40,0
	24	0,0		60,0	50,0	20,0	70,0
	48	0,0		60,0	60,0	30,0	90,0
	72	20,0	20,0	60,0	60,0	30,0	90,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	3	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	4	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	5	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	24	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	48	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	72	20,0	20,0	100,0	80,0	20,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	3	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	4	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	5	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	24	30,0		60,0	50,0	50,0	100,0
	48	30,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	80,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 14. Efeito da F3.6 (obtida pelo refracionamento da F 3) de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F 3.6 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	80,0	0,0	80,0
	3	0,0		70,0	80,0	0,0	80,0
	4	0,0		70,0	80,0	0,0	80,0
	5	0,0		70,0	80,0	0,0	80,0
	24	30,0		70,0	0,0	80,0	80,0
	48	10,0		100,0	0,0	80,0	80,0
	72	10,0	50,0	100,0	0,0	80,0	80,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	100,0	0,0	100,0
	3	0,0		70,0	100,0	0,0	100,0
	4	0,0		70,0	100,0	0,0	100,0
	5	0,0		70,0	100,0	0,0	100,0
	24	10,0		70,0	40,0	60,0	100,0
	48	30,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	60,0	100,0	0,0	100,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	100,0	0,0	100,0
	3	0,0		70,0	80,0	20,0	100,0
	4	0,0		70,0	80,0	20,0	100,0
	5	0,0		70,0	80,0	20,0	100,0
	24	20,0		70,0	40,0	60,0	100,0
	48	30,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	30,0	80,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	3	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	4	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	5	0,0		100,0	80,0	20,0	100,0
	24	60,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	40,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 15. Efeito da F3.7-3.9 (obtida pelo refração da F 3) de *C. verbenacea* sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

F 3.7-3.9 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	100,0	0,0	100,0
	2	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	3	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	4	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	5	0,0		40,0	100,0	0,0	100,0
	24	10,0		100,0	40,0	60,0	100,0
	48	20,0		100,0	10,0	90,0	100,0
	72	30,0	60,0	100,0	10,0	90,0	100,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		80,0	80,0	0,0	80,0
	3	0,0		80,0	80,0	0,0	80,0
	4	0,0		80,0	80,0	0,0	80,0
	5	0,0		80,0	80,0	0,0	80,0
	24	10,0		100,0	70,0	30,0	100,0
	48	50,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	80,0	100,0	0,0	100,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	90,0	0,0	90,0
	3	0,0		100,0	90,0	0,0	90,0
	4	0,0		100,0	90,0	0,0	90,0
	5	0,0		100,0	90,0	0,0	90,0
	24	50,0		100,0	50,0	40,0	100,0
	48	30,0		100,0	10,0	90,0	100,0
	72	10,0	90,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	100,0	0,0	0,0
	3	0,0		100,0	100,0	0,0	0,0
	4	0,0		100,0	100,0	0,0	0,0
	5	0,0		100,0	100,0	0,0	0,0
	24	50,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	48	50,0		100,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

Tabela 16. Efeito da artemetina sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

Artemetina (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	70,0	0,0	0,0
	3	0,0		40,0	80,0	20,0	100,0
	4	0,0		40,0	80,0	20,0	100,0
	5	0,0		40,0	80,0	20,0	100,0
	24	30,0		60,0	40,0	60,0	100,0
	48	10,0		60,0	20,0	80,0	100,0
	72	0,0	40,0	60,0	20,0	80,0	100,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	90,0	10,0	100,0
	3	0,0		100,0	90,0	10,0	100,0
	4	0,0		100,0	90,0	10,0	100,0
	5	0,0		100,0	90,0	10,0	100,0
	24	10,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	48	20,0		100,0	20,0	80,0	100,0
	72	10,0	40,0	100,0	0,0	100,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		60,0	80,0	20,0	100,0
	3	0,0		60,0	80,0	20,0	100,0
	4	0,0		60,0	80,0	20,0	100,0
	5	0,0		60,0	80,0	20,0	100,0
	24	20,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	48	30,0		100,0	20,0	80,0	100,0
	72	10,0	60,0	100,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	3	0,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	4	0,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	5	0,0		100,0	30,0	70,0	100,0
	24	50,0		100,0	10,0	90,0	100,0
	48	10,0		100,0	10,0	90,0	100,0
	72	30,0	90,0	100,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

RESULTADOS

Tabela 17. Efeito do praziquantel (PZQ) sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

PZQ (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%)*, Δ		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		40,0	60,0	0,0	60,0
	3	0,0		40,0	60,0	0,0	60,0
	4	0,0		40,0	60,0	0,0	60,0
	5	0,0		40,0	60,0	0,0	60,0
	24	40,0		60,0	0,0	100,0	100,0
	48	40,0		60,0	0,0	100,0	100,0
	72	10,0	90,0	60,0	0,0	100,0	100,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		20,0	50,0	10,0	60,0
	3	0,0		20,0	50,0	10,0	60,0
	4	0,0		20,0	0,0	70,0	70,0
	5	0,0		20,0	0,0	100,0	100,0
	24	60,0		60,0	0,0	100,0	100,0
	48	20,0		60,0	0,0	100,0	100,0
	72	10,0	90,0	60,0	0,0	100,0	100,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	20,0	40,0	60,0
	3	0,0		0,0	20,0	40,0	60,0
	4	0,0		0,0	20,0	40,0	60,0
	5	0,0		0,0	20,0	40,0	60,0
	24	60,0		20,0	0,0	100,0	100,0
	48	20,0		20,0	0,0	100,0	100,0
	72	20,0	100,0	20,0	0,0	100,0	100,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	20,0	80,0	100,0
	3	0,0		0,0	20,0	80,0	100,0
	4	0,0		0,0	20,0	80,0	100,0
	5	0,0		0,0	20,0	80,0	100,0
	24	60,0		20,0	0,0	100,0	100,0
	48	40,0		20,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	100,0	20,0	0,0	100,0	100,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

Tabela 18. Efeito do DMSO (0,05%) sobre o acasalamento e atividade motora de adultos de *S. mansoni*.

DMSO	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Casais de vermes separados (%)**	Redução na atividade motora (%) ^{*, Δ}		
		Por hora de observação	Total****		Leve	Significativa	Total***
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		25,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		50,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
0,05%	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	3	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	4	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	5	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	24	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	48	0,0		50,0	75,0	0,0	75,0
	72	0,0	0,0	50,0	75,0	0,0	75,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 casais nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes que sofreram reduções (leves ou significativas) na motilidade referente a cada observação; **** Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ^ΔRedução na atividade motora: leve - alteração de muita movimentação (+++) para intermediária (++) , significativa - alteração de muita movimentação ou intermediária (+++ e ++, respectivamente) para pouca ou nenhuma movimentação (+ e -, respectivamente).

5.2.4 Efeito de OE, FAEE, FOEE, refracionamentos e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, sobre alterações tegumentares, musculares e em órgãos internos sobre adultos de *S. mansoni*.

Todas as amostras testadas provocaram alterações tegumentares nos vermes, sendo essas mais freqüentes nos machos e estando relacionadas ao aumento da concentração e ao tempo de observação. Alterações nesse parâmetro de até 100% foram vistas para as FOEE, F3.6 e F3.7-3.9 com a concentração de 400 µg/mL (tabelas 19 a 28).

As alterações musculares, provocadas por contrações após a adição das amostras no meio de cultura, só não foi observada para o FAEE e OE. As demais amostras apresentaram-se dependentes da concentração para esse parâmetro e esta ocorreu principalmente nos vermes machos.

O grupo controle positivo apresentou 100% de vermes contraídos para a concentração de 400 µg/mL e de 90% para as demais (50, 100 e 200 µg/mL), sendo o grupo que apresentou maior porcentagem de vermes contraídos, principalmente os machos (tabela 29).

As contrações musculares implicaram em diminuição significativa da movimentação do verme (comparando-se os padrões de movimentação das tabelas 7 a 16 com as contrações nas tabelas 19 a 28), porém o contrário não foi verdadeiro, já que alguns vermes que apresentaram redução significativa do movimento não mostraram-se contraídos.

Alterações nos órgãos internos (protuberâncias localizadas após o ovário das fêmeas) foi observada nos vermes submetidos ao FAEE e aos refracionamentos da F3 ou seja, com as concentrações de 400 µg/mL; 50, 100, 200 e 400 µg/mL e 100, 200 e 400 µg/mL, respectivamente, e ao PZQ (grupo controle positivo), em que houve alteração para esse parâmetro em 100% das fêmeas, para todas as concentrações.

Não foram encontradas alterações tegumentares, musculares e em órgãos internos nos vermes do grupo controle negativo e DMSO 0,05% (tabela 30).

RESULTADOS

Tabela 19. Efeito do OE de *C. verbenacea* sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

OE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**												
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos						
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****		
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	10,0			20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	10,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	10,0			40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	30,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	10,0			60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	30,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	10,0			60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	30,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 20. Efeito do FAEE de *C. verbenacea* sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

FAEE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**									
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos			
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	10,0	10,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	20,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			40,0	20,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	30,0	30,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			40,0	20,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	20,0			40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	20,0	20,0
72	10,0	30,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 21. Efeito da FOEE de *C. verbenacea* sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

FOEE (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**										
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos				
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	10,0			40,0	0,0	20,0	60,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
	48	40,0			60,0	0,0	30,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	60,0	60,0	0,0	30,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	10,0			80,0	20,0	50,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
	48	70,0			100,0	20,0	60,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
	72	10,0	90,0	100,0	20,0	60,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	80,0			100,0	60,0	80,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0
	48	20,0			100,0	60,0	80,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	100,0	100,0	60,0	80,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			80,0	0,0	40,0	80,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			80,0	0,0	40,0	80,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			80,0	0,0	40,0	80,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			80,0	80,0	40,0	80,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0			100,0	100,0	100,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			100,0	100,0	100,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos; ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 22. Efeito da F1-2 (obtida pelo fracionamento da FOEE) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F1-2 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*		Alterações (%)**										
		Por hora de observação	Total***	Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos				
				Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****		
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	10,0	10,0	40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	20,0	40,0	0,0	20,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	20,0	40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		60,0	20,0	40,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	10,0		80,0	80,0	80,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	60,0	70,0	80,0	80,0	80,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 23. Efeito da F3 (obtida pelo fracionamento da FOEE) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F3 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**																			
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos													
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****									
0	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	0,0																				
	48	0,0																				
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	10,0																				
	48	40,0																				
72	30,0	80,0	40,0	40,0	40,0	40,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	10,0																				
	48	40,0																				
72	40,0	90,0	60,0	40,0	50,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	60,0																				
	48	20,0																				
72	30,0	100,0	40,0	60,0	50,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	100,0																				
	48	0,0																				
72	0,0	100,0	80,0	20,0	50,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 24. Efeito da F4-5 (obtida pelo fracionamento da FOEE) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F4-5 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**																		
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos												
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****								
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	24	30,0			40,0	0,0	20,0	60,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	20,0			60,0	20,0	40,0	60,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	70,0	60,0	20,0	40,0	60,0	60,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	24	40,0			80,0	20,0	50,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	20,0			100,0	20,0	60,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	80,0	100,0	20,0	60,0	80,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	24	60,0			80,0	20,0	50,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	40,0			100,0	20,0	60,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	100,0	100,0	20,0	60,0	80,0	80,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	24	100,0			100,0	60,0	80,0	100,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			100,0	60,0	80,0	100,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	100,0	100,0	60,0	80,0	80,0	100,0	100,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 25. Efeito da F3.5 (obtida pelo refracionamento da F 3) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F3.5 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**																	
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos											
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****							
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			20,0	20,0	20,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			20,0	20,0	20,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			20,0	20,0	20,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			20,0	20,0	20,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	80,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			40,0	40,0	40,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			40,0	40,0	40,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	20,0	20,0	40,0	40,0	40,0	40,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	80,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	30,0			80,0	60,0	70,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0
	48	30,0			100,0	60,0	80,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0
72	20,0	80,0	100,0	60,0	80,0	80,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	20,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 26. Efeito da F3.6 (obtida pelo refracionamento da F 3) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F3.6 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**												
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos						
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****		
0	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	30,0		60,0	40,0	50,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
	48	10,0		80,0	60,0	70,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
72	10,0	50,0	80,0	60,0	70,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
100	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	80,0	20,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	10,0		60,0	60,0	60,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
	48	30,0		100,0	60,0	80,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
72	20,0	60,0	100,0	60,0	80,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
200	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	20,0		60,0	60,0	60,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
	48	30,0		100,0	80,0	90,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
72	30,0	80,0	100,0	80,0	90,0	80,0	40,0	60,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
400	1	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0		0,0	0,0	0,0	40,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0		100,0	100,0	100,0	40,0	40,0	40,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0
	24	60,0		100,0	100,0	100,0	80,0	40,0	60,0	0,0	40,0	20,0	20,0	20,0	20,0
	48	40,0		100,0	100,0	100,0	100,0	40,0	60,0	0,0	40,0	20,0	20,0	20,0	20,0
72	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	40,0	60,0	0,0	40,0	20,0	20,0	20,0	20,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 27. Efeito da F3.7-3.9 (obtida pelo refração da F3) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

F3.6 (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**																			
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos													
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****									
0	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	0,0																				
	48	0,0																				
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	10,0																				
	48	20,0																				
72	30,0	60,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
100	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	10,0																				
	48	50,0																				
72	20,0	80,0	80,0	20,0	50,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0		
200	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	50,0																				
	48	30,0																				
72	10,0	90,0	80,0	60,0	70,0	40,0	0,0	20,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0	0,0	20,0	10,0		
400	1	0,0																				
	2	0,0																				
	3	0,0																				
	4	0,0																				
	5	0,0																				
	24	50,0																				
	48	50,0																				
72	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	60,0	20,0	40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	40,0	0,0	20,0	40,0		

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 28. Efeito da artemetina sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

Artemetina (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**																		
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos												
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****								
0	1	0,0																			
	2	0,0																			
	3	0,0																			
	4	0,0																			
	5	0,0																			
	24	0,0																			
	48	0,0																			
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0																			
	2	0,0																			
	3	0,0																			
	4	0,0																			
	5	0,0																			
	24	30,0																			
	48	10,0																			
72	0,0	40,0	60,0	0,0	30,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
100	1	0,0																			
	2	0,0																			
	3	0,0																			
	4	0,0																			
	5	0,0																			
	24	10,0																			
	48	20,0																			
72	10,0	40,0	60,0	0,0	30,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
200	1	0,0																			
	2	0,0																			
	3	0,0																			
	4	0,0																			
	5	0,0																			
	24	20,0																			
	48	30,0																			
72	10,0	60,0	60,0	0,0	30,0	60,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
400	1	0,0																			
	2	0,0																			
	3	0,0																			
	4	0,0																			
	5	0,0																			
	24	50,0																			
	48	10,0																			
72	30,0	90,0	100,0	20,0	60,0	60,0	20,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 29. Efeito do praziquantel (PZQ) sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

PZQ (µg/mL)	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**									
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos			
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas
0	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
50	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	3	0,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	4	0,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	5	0,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	24	40,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
	48	40,0			80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
72	10,0	90,0	80,0	40,0	60,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0	50,0	
100	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	3	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	4	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	5	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	24	60,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
	48	20,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
72	10,0	90,0	100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0	50,0	
200	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	3	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	4	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	5	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	0,0
	24	60,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
	48	20,0			100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0
72	20,0	100,0	100,0	80,0	90,0	100,0	80,0	90,0	0,0	100,0	50,0	
400	1	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	3	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	4	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	5	0,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	24	60,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	40,0			100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
72	0,0	100,0	100,0	80,0	90,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	50,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

RESULTADOS

Tabela 30. Efeito do DMSO 0,05% sobre o tegumento, musculatura e órgãos internos de adultos de *S. mansoni*.

DMSO	Tempo de observação (horas)	Mortalidade (%)*	Alterações (%)**										
			Tegumentares			Musculares (contrações)			Órgãos internos				
			Por hora de observação	Total***	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****	Machos	Fêmeas	Total****
0	1	0,0											
	2	0,0											
	3	0,0											
	4	0,0											
	5	0,0											
	24	0,0											
	48	0,0											
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
0,05%	1	0,0											
	2	0,0											
	3	0,0											
	4	0,0											
	5	0,0											
	24	0,0											
	48	0,0											
72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

*Porcentagem em relação à 10 vermes; **Porcentagem em relação à 5 vermes nos grupos testes (que receberam amostras/fármacos) e 4 no grupo controle (sem adição de amostras/fármacos); ***Total de vermes ao término do experimento, após 72 horas de observação; ****Total de vermes que sofreram alterações musculares, tegumentares e em órgãos internos em relação a cada período de observação (porcentagem em relação à 10 vermes).

5.2.5 Efeito de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, sobre a oviposição das fêmeas adultas de *S. mansoni*

Das amostras inicialmente testadas (OE, FAEE e FOEE), a que apresentou menor quantidade de ovos por fêmea foi a FOEE (havendo oviposição de em média 9 a 12 ovos para as concentrações de 100 e 50 µg/mL, respectivamente) em comparação ao grupo controle negativo (média de 30 ovos) e DMSO 0,05% (média de 40 ovos), que embora não tenha diferido estatisticamente, há diferença biológica importante.

Para as F3 e F4-5, oriundas do fracionamento da FOEE, não houve oviposição. Para o refração da F3 houve também ausência para as F3.6 e F3.7-3.9. A artemetina, além do grupo controle positivo (PZQ), também apresentaram esse mesmo resultado.

Foi observado que a oviposição nem sempre foi dependente da concentração testada. O FAEE, por exemplo, demonstrou menor quantidade de ovos por fêmea para a concentração mais baixa e mais alta (50 e 400 µg/mL). O OE mostrou menor oviposição com a concentração de 100 µg/mL e a F1-2 para as de 100 e 400 µg/mL. A F3.5 apresentou ovos apenas com a concentração de 100 µg/mL. Por outro lado, nas frações em que houve oviposição, esta foi dependente do período de observação, tendo o pico ocorrido na 72^a hora.

A tabela 31 e as figuras 19 a 22 mostram o padrão de oviposição para as amostras testadas.

Tabela 31. Ação das amostras de *C. verbenacea* na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.

	Oviposição em 72 horas ($\bar{X} \pm D.P.*$)				
	0 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
OE	-	26 ± 30	0,8 ± 1,78	38,8 ± 86,7	73,4 ± 43,0 a b c d e f g h j
FAEE	-	4,6 ± 9,3	63,8 ± 52,7	43,4 ± 74,0	1,6 ± 3,0 h i
FOEE	-	7,8 ± 17,4	2,8 ± 6,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 j k
F1-2	-	17,4 ± 35,0	0,8 ± 1,3	26,6 ± 26,8	0,0 ± 0,0 a l
F3	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 b m
F4-5	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 c n
F3.5	-	0,0 ± 0,0	12,6 ± 18,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 o
F3.6	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 p
F3.7-3.9	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 d q
Artemetina	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 e r
Praziquantel	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 f s
DMSO 0,05%	40,0 ± 59,9 g	-	-	-	-
Controle**	30,0 ± 16,4 i k l m n o p q r s	-	-	-	-

* D.P. – Desvio Padrão. ** Grupo controle negativo – sem adição de amostras ou fármaco. Letras iguais correspondem à diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

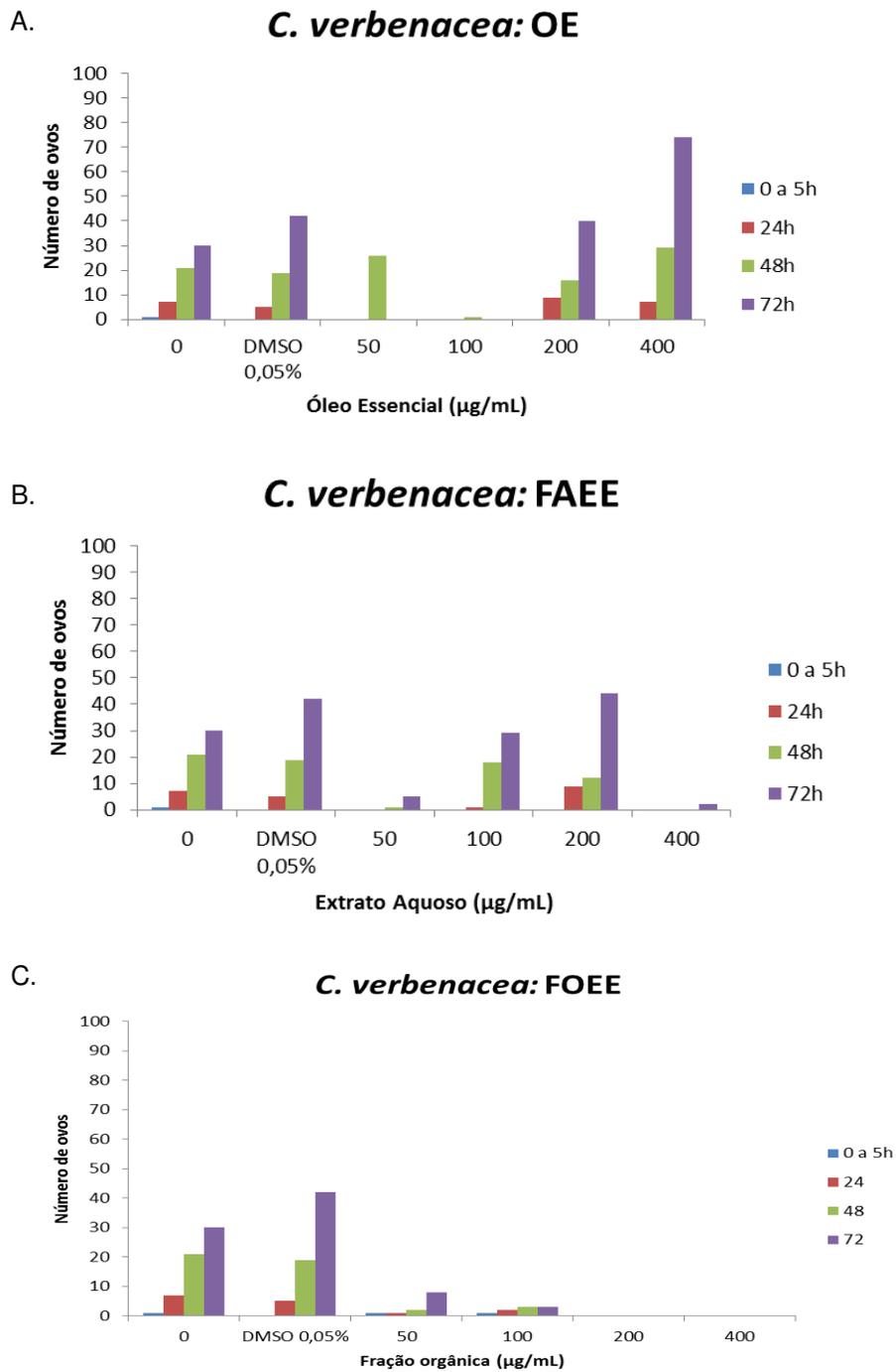
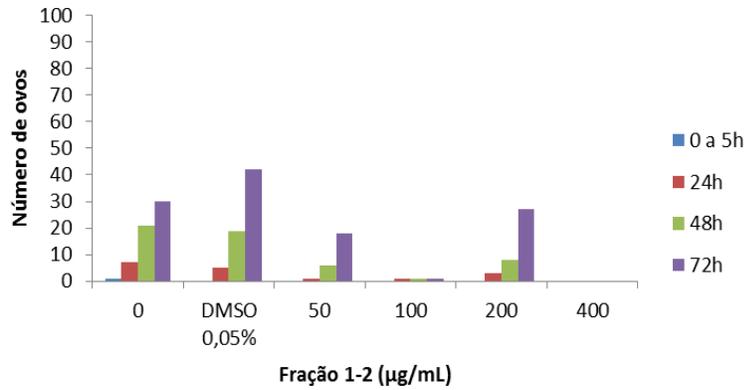


Figura 19. (A) (B) e (C): Ação do OE, FAEE e FOEE na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.

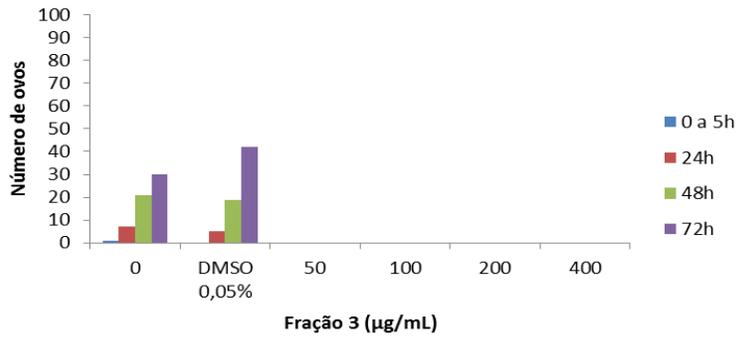
A.

***C. verbenacea*: F1-2**



B.

***C. verbenacea*: F3**



C.

***C. verbenacea*: F4-5**

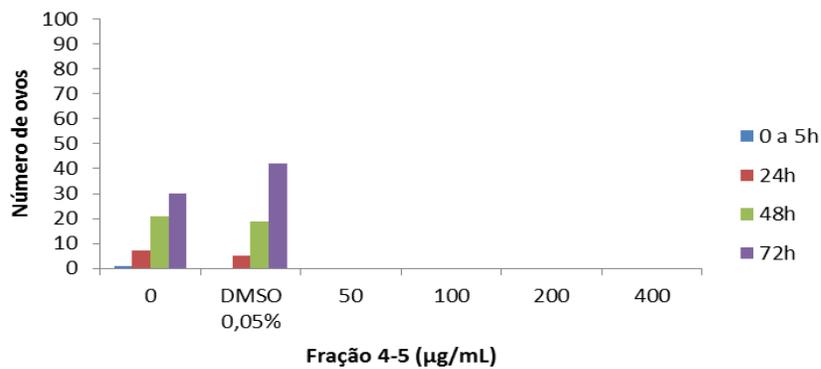


Figura 20. (A) (B) e (C): Ação das F1-2, F3 e F4-5 (obtidas do fracionamento da FOEE) na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.

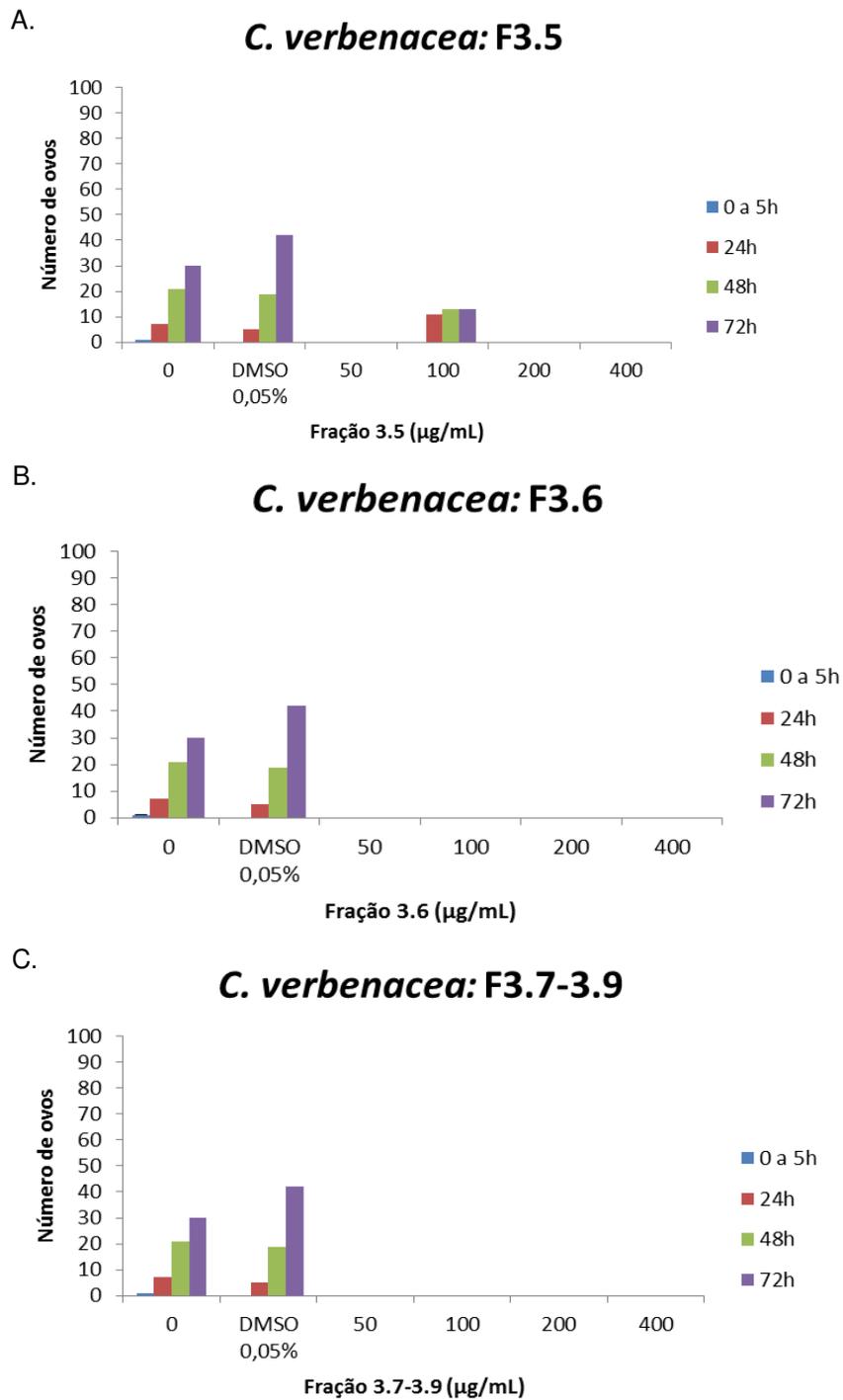


Figura 21. (A) (B) e (C): Ação das F3.5, F3.6 e F3.7-3.9 (obtidas do refracionamento da F3) na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.

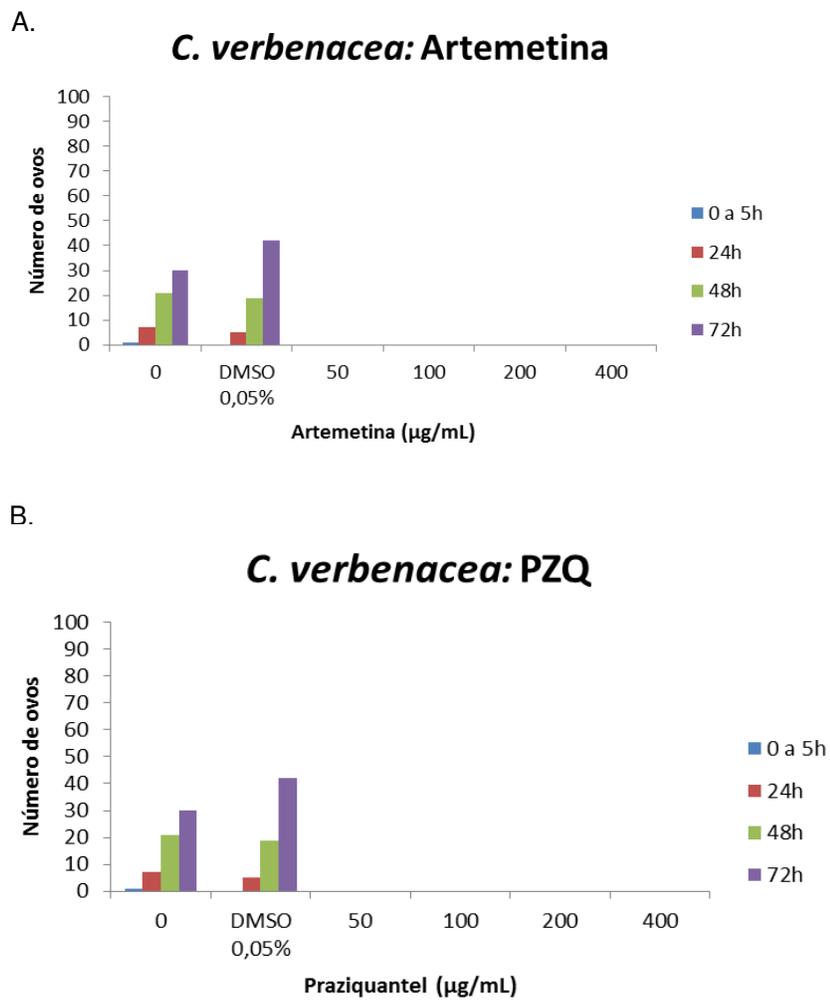


Figura 22. (A) e (B): Ação da artemetina e do PZQ na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.

5.2.6 Cálculo das DLs 50 e 90

O grupo controle positivo foi o que apresentou menores DLs 50 e 90. Em relação às amostras testadas, as FOEE e F3 apresentaram as menores concentrações para as DLs 50 e 90, em comparação às outras, conforme pode ser observado na tabela 32.

Tabela 32. DLs 50 e 90 das amostras testadas *in vitro*.

Amostras	DL 50 µg/mL	DL 90
OE	>400,0	>400,0
FAEE	>400,0	>400,0
FOEE	<50,0	144,1
F1-2	307,3	546,8
F3	<50,0	116,6
F4-5	<50,0	150,0
F3.5	272,0	497,5
F3.6	27,7	311,7
F3.7-3.9	<50	188,47
Artemetina	137,9	402,3
PZQ	<50	70

5.2.7 Amostras de maior atividade

As amostras com maior atividade anti-*S. mansoni in vitro* (FOEE e F3), foram escolhidas para serem submetidas a ensaios *in vivo*. A tabela 33 mostra a comparação dos resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados.

Tabela 33: Atividade anti-*S. mansoni* das diferentes amostras testadas. As amostras com maior quantidade de concentrações que atingiram taxas de 100% para o parâmetro analisado foram consideradas mais ativas contra o verme.

	Parâmetros analisados							Total de Concentrações**
	Ação esquistossomícida para 100% dos vermes	Ação esquistossomícida mais rápida - 100% dos vermes mortos em 24 horas	Alterações Tegumentares em 100% dos vermes	Alterações musculares (contrações) em 100% dos vermes	Alterações em órgãos internos em 100% dos vermes	Separação de 100% dos casais de vermes	Ausência de oviposição	
Quantidade de concentrações (µg/mL) que atuaram para 100% dos vermes								
OE	0*	0	0	0	0	2 (200 e 400)	0	2
FAEE	0	0	0	0	0	3 (100, 200 e 400)	0	3
FOEE	2 (200 e 400)	0	1 (400)	0	0	3 (100, 200 e 400)	2 (200 e 400)	8
F1-2	0	0	1 (400)	0	0	1 (400)	1 (400)	3
F3	2 (200 e 400)	1 (400)	0	0	0	4 (50, 100, 200 e 400)	4 (50, 100, 200 e 400)	11
F4-5	2 (200 e 400)	1	0	0	0	4 (50, 100, 200 e 400)	4 (50, 100, 200 e 400)	11
F3.5	0	0	0	0	0	3 (100, 200 e 400)	3 (100, 200 e 400)	6
F3.6	1 (400)	0	1 (400)	0	0	4 (50, 100, 200 e 400)	4 (50, 100, 200 e 400)	10
F3.7-3.9	1 (400)	0	1 (400)	0	0	4 (50, 100, 200 e 400)	4 (50, 100, 200 e 400)	10
Artemetina	0	0	0	0	0	3 (100, 200 e 400)	4 (50, 100, 200 e 400)	7
PZQ	2 (200 e 400)	0	3 (100, 200 e 400)	1 (400)	4 (50, 100, 200 e 400)	0	4 (50, 100, 200 e 400)	14

*Quantidade de concentrações que tiveram taxa de 100% para o parâmetro analisado. **Somatória das concentrações que tiveram taxa de 100% para os parâmetros analisados.

De acordo com a tabela 33 as amostras com maior atividade anti-*S. mansoni* foram, em relação as amostras primeiramente testadas (FAEE, OE e FOEE), a FOEE, com até 8 concentrações que tiveram taxas de 100% de reduções/alterações para os parâmetros analisados. Do seu fracionamento, em que se obtiveram as F1-2, F3 e F4-5 essas duas últimas demonstraram-se mais ativas, com 11 concentrações. As frações obtidas com o refracionamento da F3, demonstraram menor atividade que esta.

Por meio dessas análises a F3 e F4-5 tiveram atividade parecida. Foi, portanto, considerada a 3 mais ativa devido as taxa de mortalidade dos vermes nas concentrações mais baixas (50 e 100 µg/mL) terem sido superiores (80 e 90%, respectivamente) em relação à 4-5 (70 e 80%, respectivamente).

Dessa forma para dar continuidade aos ensaios *in vivo*, foi escolhido uma das frações testadas inicialmente, nesse caso a FOEE, e um refracionamento, a F3, pois além de terem apresentado maior atividade contra os vermes e as menores concentrações para as DLs 50 e 90, também possuíram boa solubilidade na solução PBS usada como veículo.

5.3 Ensaio *in vivo*

5.3.1 Ação das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de *S. mansoni*

O efeito das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliado por meio da administração oral de diferentes concentrações dessas amostras (40, 100, 200 e 300 mg/kg) em camundongos Balb/c, relacionando-as com o PZQ e grupo controle negativo (que recebeu apenas solução tampão PBS).

Comparando-se os resultados obtidos para o total médio de vermes recuperados do sistema porta hepático, nos mesmos grupos de tratamento - ou seja, realizados no mesmo período e concentração - foi possível analisar que aos 45 dias de infecção (tabela 34 e figura 23), com 40 e 200 mg/kg, os valores encontrados para esse parâmetro não diferiram significativamente entre as frações testadas, o PZQ e o grupo controle. A F3, 100 mg/kg, diferiu significativamente do PZQ nessa mesma concentração (9,7 e 14,6, respectivamente, $p = 0,0379$). Diferenças significativas também foram obtidas entre a F3, 300 mg/kg, e o PZQ (17,2 e 4,2, respectivamente, $p < 0,0001$) e entre esta e a FOEE (17,2 e 9,1, respectivamente, $p = 0,0025$) nessa mesma concentração.

A quantidade de vermes acasalados, ainda em relação aos mesmos grupos de tratamento, foi significativamente diferente apenas entre PZQ e FOEE, na concentração de 40 mg/kg (5,2 e 4,2, respectivamente, $p = 0,018$). O número de vermes machos e fêmeas não apresentou diferenças significativas entre os mesmos grupos de tratamento.

De acordo com esses dados, pode-se avaliar que as concentrações:

- 40 mg/kg - não teve diferença significativa entre as amostras/fármaco testados para o total médio de vermes recuperados do sistema porta-hepático, porém, a FOEE apresentou menor quantidade de vermes acasalados;
- 100 mg/kg - o tratamento feito com o PZQ foi o de menor ação esquistossomicida;

- 200 mg/kg - não teve diferença significativa entre amostras/fármaco testados;

- 300 mg/kg - a F3 foi a de menor atividade esquistossomicida, já que a quantidade de vermes recuperados foi superior e significativa em relação à FOEE e ao PZQ.

Para os tratamentos efetuados no 45º dia de infecção, não houve diferença significativa para o total de vermes recuperados, quantidade de vermes acasalados, machos e fêmeas em relação ao grupo controle negativo (em média 12,9 vermes/camundongo), com exceção do PZQ, para o primeiro parâmetro, na concentração de 300 mg/kg (4,2 vermes, $p = 0,0026$).

Entre as concentrações testadas para as mesmas amostras, o total médio de vermes/camundongo diferiu significativamente com a F3 nas de 100 e 300 mg/kg (9,7 e 17,9, respectivamente, $p = 0,0067$) em tratamento realizado após 45 dias de infecção. Tratamentos feitos com o PZQ diferiram significativamente entre as concentrações de 100 e 300 mg/kg (14,6 e 4,2, respectivamente, $p < 0,0001$) e 200 e 300 mg/kg (13,6 e 4,2, respectivamente, $p = 0,0017$) para o total de vermes recuperados e de 200 e 300 mg/kg para a quantidade de vermes acasalados (3,5 e 1,8, respectivamente, $p = 0,0255$).

A quantidade de vermes machos diferiu significativamente entre as concentrações da FOEE de 40 e 200 mg/mL (3,4 e 9,1, respectivamente, $p = 0,0417$), 100 e 300 mg/mL (7,3 e 8,1, respectivamente, $p = 0,0063$) e de 200 e 300 mg/kg (9,1 e 8,1, respectivamente, $p = 0,0017$).

Assim, pode-se afirmar que as seguintes amostras/fármaco:

- FOEE - teve ação esquistossomicida parecida para todas as concentrações testadas, já que não houve diferença significativa entre essas e o total de vermes recuperados do sistema porta-hepático. A concentração de 40 mg/kg foi a que apresentou menor quantidade de vermes machos;

- F3 - teve maior atividade esquistossomicida na concentração de 100 mg/kg, uma vez que apresentou diferença significativa para o total de vermes em

relação a de 200 mg/kg; apesar de não ter sido estatisticamente significativa a diferença entre as concentrações de 100 e 300 mg/kg, pode se inferir que biologicamente foi importante, já que foram recuperados 9,7 e 18,6 vermes, respectivamente;

- PZQ - a maior atividade esquistossomicida foi para a concentração de 300 mg/kg em que foram recuperadas menores quantidades de vermes que as demais concentrações (sendo que para esse parâmetro a diferença foi significativa em relação a de 100 e 200 mg/kg) além de ter sido encontrada menor quantidade de vermes acasalados.

Nos tratamentos realizados aos 45 dias de infecção, a maior porcentagem de eficiência/taxa de redução de vermes, ocorreu com o PZQ, na concentração de 300 mg/kg (67,4%). Das amostras testadas, obteve-se com a FOEE redução de até 31% (40 mg/kg) e para a F3, de até 24,8% (100 mg/kg), sendo possível verificar que para a FOEE, a concentração mais baixa teve maior ação esquistossomicida e para a 3, as mais altas (200 e 300 mg/kg) não apresentaram redução de vermes, ou seja, não são dose-dependente para esse parâmetro.

O tratamento que mais apresentou deslocamento dos vermes para o fígado foram os efetuados com 300 mg/kg de PZQ e FOEE (10,6 e 10,7%, respectivamente).

A razão relativa ao sexo (R.R.S.) demonstrou que tratamentos feitos com PZQ atuaram mais sobre as fêmeas em todas as concentrações. Nos efetuados com a FOEE houve ação preferencial por fêmeas em todas as concentrações, com exceção da de 40 mg/kg. Com a F3, houve ação preferencial sobre os machos nas concentrações mais baixas (40 e 100 mg/kg) e, sobre as fêmeas, nas mais altas (200 e 300 mg/kg) em tratamento realizado aos 45 dias de infecção. Nos realizados aos 60 dias com essa amostra, houve ação preferencial por fêmeas.

Nos tratamentos realizados aos 60 dias de infecção (tabela 35), não houve diferença significativa no total médio de vermes nos mesmos grupos de tratamento

- ou seja, realizados no mesmo período e concentração e também no grupo controle negativo. Em relação às concentrações testadas para a mesma amostra/fármaco, houve diferença significativa entre o total médio de vermes recuperados em camundongos submetidos a tratamento com 40 e 200 mg/kg de PZQ (15,9 e 7,6, respectivamente, $p = 0,0003$) além da quantidade de vermes machos recuperados nos camundongos submetidos à F3, na concentração de 40 e 200 mg/kg (4,5 e 7,3 mg/mL, $p = 0,0004$).

Porcentagens de eficiência/reduções de vermes de até 38,7% foram apresentadas pelo PZQ na concentração de 200 mg/kg. Das amostras testadas, a F3 foi a que apresentou maior taxa (12,9%), na concentração de 200 mg/kg. As porcentagens de eficiência foram menores em relação aos tratamentos feitos aos 45 dias de infecção, para as amostras testadas.

Comparando-se os dois dias de tratamento, a FOEE, 40 mg/kg, diferiu significativamente já que foram recuperados em média 8,9 e 11,5, aos 45 e 60 dias, respectivamente ($p = 0,0302$). Os grupos tratados com PZQ apresentaram diferença significativa para o total de vermes em ambos os dias de tratamento com a concentração de 200 mg/kg (13,6 e 7,6, aos 45 e 60 dias, respectivamente, $p = 0,0206$). Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de vermes acasalados, machos e fêmeas entre os tratamentos feitos aos 45 e 60 dias.

RESULTADOS

Tabela 34. Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, em tratamento feito aos 45 dias de infecção.

45 dias Concentração (mg/kg)	Tratamento	Vermes recuperados: perfusão do sistema porta-hepático				Redução de vermes %	Vermes no fígado $\bar{X} \pm D.P.$	Fuga para o fígado %	*R. R. S.
		Casal $\bar{X} \pm D.P.$	Macho $\bar{X} \pm D.P.$	Fêmea $\bar{X} \pm D.P.$	Total $\bar{X} \pm D.P.$				
40	PZQ	5,2 ± 3,5 a	7,6 ± 7,5	0,9 ± 1,4	13,7 ± 8,4	-	0,0	0,0	2,9
	FOEE	4,2 ± 2,8 a	3,4 ± 2,3 c	1,3 ± 1,2	8,9 ± 5,5	31,0	0,7	7,3	0,9
	F3	6,5 ± 3,0	2,0 ± 1,0	1,8 ± 0,9	10,3 ± 3,8	20,1	0,0	0,0	0,4
100	PZQ	2,9 ± 2,0	10,6 ± 6,2	1,0 ± 1,7	14,6 ± 5,8 f k	-	0,3	2,0	3,6
	FOEE	3,2 ± 1,9	7,3 ± 4,8 d	1,4 ± 1,3	12,9 ± 7,5	-	0,8	5,8	1,8
	F3	5,0 ± 2,3	2,0 ± 1,9	2,7 ± 2,0	9,7 ± 4,4 f j	24,8	0,0	0,0	0,2
200	PZQ	3,5 ± 3,0 b	9,8 ± 5,6	0,3 ± 0,7	13,6 ± 5,5	-	0,2	8,3	11,2
	FOEE	1,1 ± 1,1	9,1 ± 6,7 c e	0,5 ± 0,7	10,7 ± 6,5	17	0,6	5,3	6,2
	F3	4,8 ± 3,0	12,2 ± 4,6	1,5 ± 1,3	18,6 ± 6,8 j	-	1,0	5,1	2,8
300	PZQ	1,8 ± 2,6 b	2,3 ± 2,9	0,1 ± 0,3	4,2 ± 5,1 g h k	67,4	0,5	10,6	7,9
	FOEE	0,8 ± 0,8	8,1 ± 3,7 d e	0,2 ± 0,6	9,1 ± 3,8 i	29,4	1,1	10,7	13,9
	F3	5,1 ± 1,1	10,4 ± 4,9	2,4 ± 2,7	17,9 ± 5,2 g i	-	0,6	3,2	1,5
0	CONTROLE**	5,4 ± 2,2	5,6 ± 3,7	1,9 ± 1,5	12,9 ± 4,6 h	-	0,5	3,7	1,0

*R.R.S. - Razão relativa ao sexo (índices maiores que 1,0 indicam maior ação sobre as fêmeas e, quando menores que 1,0, indicam maior ação sobre os machos); **CONTROLE - Grupo Controle Negativo; Letras iguais correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos .D.P. – Desvio Padrão.

Tabela 35. Efeito das diferentes concentrações das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, em tratamento feito aos 60 dias de infecção.

60 dias Concentração (mg/kg)	Tratamento	Vermes recuperados: perfusão do sistema porta-hepático				Redução de vermes %	Vermes no fígado $\bar{X} \pm D.P.$	Fuga para o fígado %	*R. R. S.
		Casal $\bar{X} \pm D.P.$	Macho $\bar{X} \pm D.P.$	Fêmea $\bar{X} \pm D.P.$	Total $\bar{X} \pm D.P.$				
40	PZQ	9,2 ± 4,2	3,3 ± 1,7	3,3 ± 0,4	15,9 ± 6,7 a	-	0,0	-	1,0
	FOEE	7,1 ± 2,9	2,2 ± 2,2	2,2 ± 3,0	11,5 ± 3,9	7%	0,0	-	1,0
	F3	8,0 ± 2,8	4,5 ± 5,0 b	3,8 ± 1,0	16,3 ± 5,9	-	0,0	-	1,2
200	PZQ	3,6 ± 2,0	3,8 ± 2,4	1,1 ± 2,9	7,6 ± 2,5 a	38,7%	0,4	5,2	3,4
	FOEE	9,2 ± 5,4	1,0 ± 1,7	1,0 ± 2,0	13,1 ± 9,8	-	0,0	-	1,0
	F3	2,7 ± 2,2	7,3 ± 2,2 b	0,8 ± 2,1	10,8 ± 5,8	12,9%	0,5	4,2	9,1
0	CONTROLE**	6,4 ± 4,6	3,2 ± 3,5	3,3 ± 3,6	12,4 ± 7,8	-	0,1	0,8	1,0

*R.R.S. - Razão relativa ao sexo (índices maiores que 1,0 indicam maior ação sobre as fêmeas e, quando menores que 1,0, indicam maior ação sobre os machos); **CONTROLE - Grupo Controle Negativo; Letras iguais correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos. D.P. – Desvio Padrão.

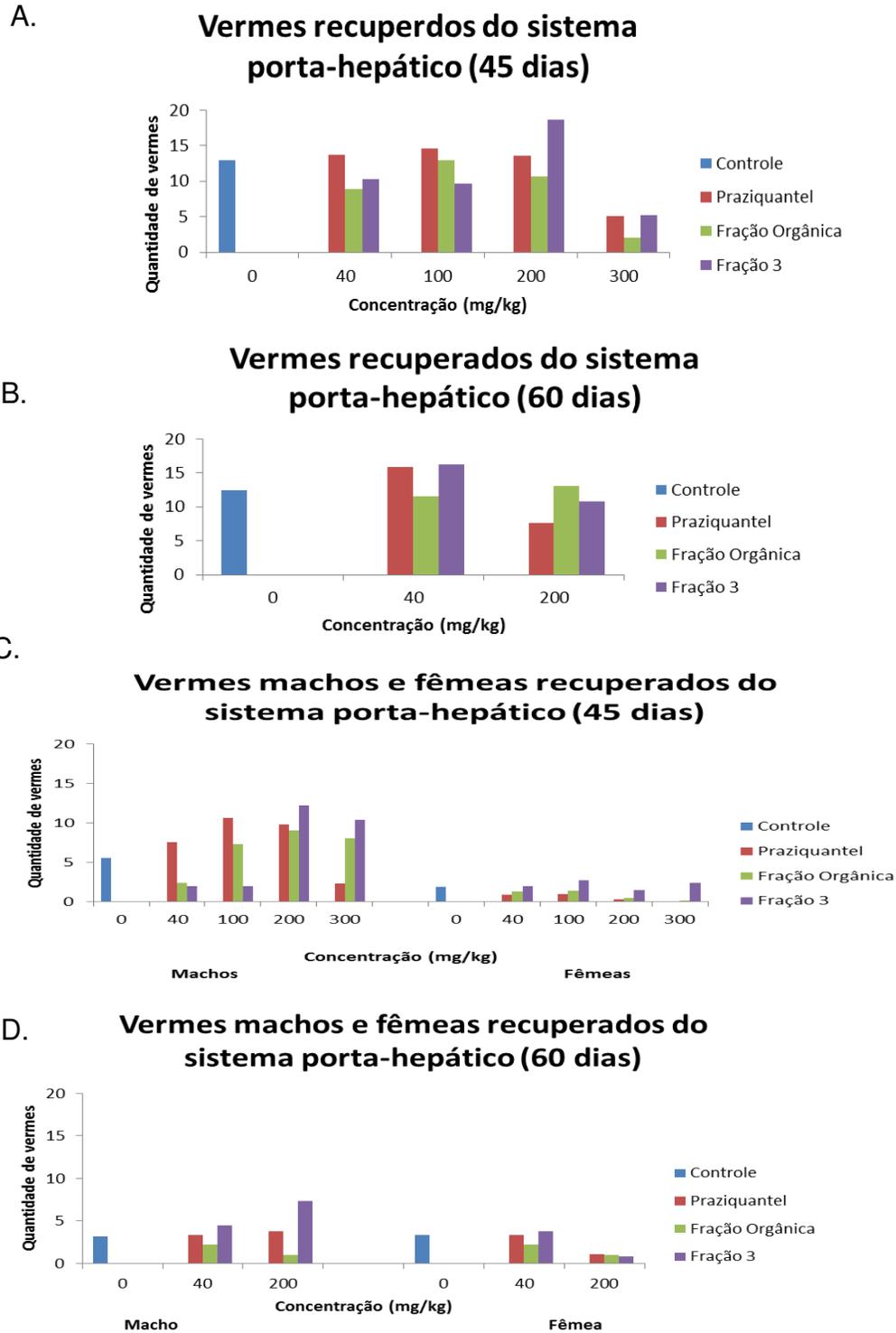


Figura 23. Avaliação da ação esquistossomicida - *in vivo* - das FOEE e F3, comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg - não tratado) e com o PZQ. (A) e (B): Vermes recuperados do sistema porta-hepático em tratamentos realizados aos 45 dias pós infecção; (C) e (D): Vermes machos e fêmeas recuperados do sistema porta-hepático em tratamentos efetuados aos 45 e 60 dias de infecção.

5.3.2 Ação das FOEE e F3 sobre a oviposição de *S. mansoni*

5.3.2.1 Ação das FOEE e F3 sobre OPG e Oograma

O efeito das FOEE e F3 sobre a oviposição de *S. mansoni* foi avaliada por meio da quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) e confecção do oograma, 15 dias após a administração do tratamento via oral, em camundongos Balb/c. Esses dados foram relacionados com o PZQ e grupo controle negativo (que recebeu apenas solução tampão PBS).

Em relação à OPG, não houve diferença significativa para a quantidade média de ovos entre os mesmos grupos de tratamento (ou seja, aqueles que receberam diferentes amostras no mesmo dia e com a mesma concentração) tanto nos realizados aos 45 (tabela 36 e figura 24), como aos 60 dias (tabela 36 e figura 24).

As concentrações testadas, para as diferentes amostras e PZQ, não apresentaram diferenças significativas em OPG nos tratamentos feitos no 45º dia, com exceção da F3, cuja concentração de 100 e 200 mg/kg diferiram significativamente (873,0 e 295,2 ovos/grama de fezes, respectivamente, $p = 0,048$).

Diferiram estatisticamente do grupo controle negativo em OPG (1003,4 ovos/grama de fezes) os tratamentos realizados nesse mesmo período com 40 (316,7 ovos, $p = 0,0421$) e 200 mg/kg (620,7, $p = 0,0005$) de PZQ; 100 (873,0 ovos, $p = 0,0248$), 200 (295,2 ovos, $p = 0,0248$) e 300 mg/kg (452,0 ovos, $p = 0,0494$) de F3; 300 mg/kg (811,3 ovos, $p = 0,0494$) de FOEE. Dessa forma, o tratamento que apresentou maior eficiência para esse parâmetro, quando efetuado no 45º dia de infecção, foi com 300 mg/kg de PZQ e, em seguida, 200 mg/kg de F3, pois, além de apresentarem menor OPG e desta ser estatisticamente menor em comparação ao grupo controle negativo, demonstraram maior porcentagem de redução de ovos (81,1 e 70,5%, respectivamente).

Nos tratamentos realizados no 60º dia de infecção, não houve diferenças significativas para a quantidade de ovos/grama de fezes entre os mesmos grupos.

Comparando-se as concentrações testadas para as amostras e PZQ, a OPG diferiu significativamente entre 40 e 200 mg/kg de FOEE (625,5 e 84,4, respectivamente, $p = 0,0056$) e de F3 (1294,6 e 335,7, respectivamente, $p = 0,048$). Diferiram também do grupo controle as concentrações de 40 e 200 mg/kg de FOEE (625,5 e 84,4, respectivamente, $p = 0,0076$). Sendo assim, para tratamentos realizados nesse período, o que apresentou maior eficiência para esse parâmetro foi a FOEE na concentração de 200 mg/kg, com taxa de redução de ovos de 85,1%.

Entre os dois dias de tratamento, houve diferença significativa de OPG apenas com a F3 na concentração de 40 mg/kg (598,6 - 45 dias - e 1294,6 - 60 dias -, $p = 0,0283$). Não houve diferença significativa em ambos os dias nos outros grupos de tratamento e nem para os grupos controles negativos.

Em relação ao oograma, realizado nos camundongos submetidos à tratamento no 45º dia de infecção (tabela 37 e figura 25), não houve diferença significativa para os estágios de desenvolvimento dos ovos (imaturos, maduros ou mortos) entre os mesmos grupos de tratamento. No entanto, algumas concentrações, com as mesmas amostras ou PZQ, mostram-se significativamente diferentes entre si, para o encontro de ovos viáveis ou mortos. As concentrações de 40 e 300 mg/kg de PZQ (35,1 e 3,0 ovos, respectivamente, $p = 0,008$) e FOEE (42,3 e 10,1 ovos, respectivamente, $p = 0,0235$), por exemplo, diferiram significativamente para ovos imaturos, assim como as de 200 e 300 de PZQ (14,8 e 3,0 ovos, respectivamente, $p = 0,0163$). Apenas as concentrações de 40 mg/kg de PZQ e FOEE não diferiram significativamente do grupo controle negativo para o encontro de ovos imaturos no oograma.

Para a quantidade de ovos maduros houve diferença significativa com as concentrações de 40 e 200 mg/kg (38,8 e 12,6 ovos, respectivamente, $p = 0,0435$), 40 e 300 mg/kg (38,8 e 10,9 ovos, respectivamente, $p = 0,0207$) e 100 e 300 mg/kg (28,8 e 10,9, respectivamente, $p = 0,0333$) de PZQ; 40 e 300 mg/kg (34,9 e 8,5 ovos, respectivamente, $p = 0,017$) e 100 e 300 mg/kg de FOEE (30,4 e 8,5 ovos, respectivamente, $p = 0,0191$); 40 e 100 mg/kg de F3 (36,8 e 13,4,

respectivamente, $p = 0,0258$). A F3, 40 mg/kg, foi o único tratamento que não apresentou-se significativamente diferente para ovos maduros, em relação ao grupo controle negativo.

Comparando-se os mesmos grupos de tratamento, houve diferença significativa para a quantidade de ovos mortos no realizado com a concentração de 100 mg/kg, entre as FOEE e F3 (2,7 e 32,3, respectivamente, $p < 0,0001$). Em relação às concentrações testadas para uma mesma amostra, apresentaram-se significativamente diferentes a quantidade de ovos mortos em 40 e 100 mg/kg de F3 (9,9 e 32,3 ovos, respectivamente, $p = 0,0278$) e 100 e 200 mg/kg (2,7 e 19,6 ovos, respectivamente, $p < 0,0001$) de FOEE. Diferiram significativamente do grupo controle negativo (17,3 ovos) os tratamentos feitos com 100 (32,3 ovos, $p = 0,0016$) e 200 mg/kg de F3 (23,5 ovos, $p = 0,0016$).

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que, para o parâmetro oograma, dentre os tratamentos realizados no 45º dia de infecção se destacaram:

- O PZQ, na concentração de 300 mg/kg, pois apresentou pouca quantidade de ovos imaturos (10,6%) e maior de ovos mortos (51%). Além disso, a quantidade de ovos imaturos e maduros diferiu significativamente do grupo controle negativo, estando em menor quantidade. Apesar da quantidade de ovos mortos não ter diferido estatisticamente deste grupo, a porcentagem desses foi menor no grupo controle negativo (14,0%). Por essa razão pode ser considerado o tratamento mais ativo para esse parâmetro.

- A F3, nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/kg, pois apresentou padrão de oograma parecido com o PZQ 300 mg/kg, com menor quantidade de ovos imaturos e maior de ovos mortos. Dessas concentrações destaca-se a de 100 mg/kg, uma vez que apresentou maior porcentagem de ovos mortos (51,6%). Além disso, diferiu significativamente do grupo controle em relação à quantidade média dos ovos nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Nos tratamentos realizados aos 60 dias de infecção (tabela 36 e figura 26), houve diferença significativa entre o mesmo grupo de tratamento para a concentração de 40 mg/kg. Assim, a quantidade de ovos imaturos do PZQ (44,4 ovos) diferiu estatisticamente ($p = 0,0324$) da FOEE (21,7 ovos). Ainda para esse parâmetro, diferiu significativamente ($p = 0,0126$) do grupo controle (18,1 ovos), a F3 (21,3 ovos).

A quantidade de ovos maduros diferiu significativamente entre o mesmo grupo de tratamento para a concentração de 200 mg/kg, em que a quantidade de ovos nesse estágio de maturidade apresentados pela FOEE (37,1 ovos) diferiu significativamente ($p = 0,0335$) da F3 (18,0 ovos). Além disso, a quantidade desses ovos para o PZQ (16,3 ovos) e a FOEE (37,1 ovos), diferiram estatisticamente ($p = 0,04$), com essa mesma concentração.

Comparando-se as diferentes concentrações testadas para a mesma amostra, ou para o PZQ, houve diferença significativa na quantidade de ovos maduros nos tratamentos realizados com PZQ (58,9 ovos - 40 mg/kg - e 16,3 ovos - 200 mg/kg -, $p = 0,0002$) e também com F3 (27,5 - 40 mg/kg - e 15,0 ovos - 200 mg/kg -, $p = 0,0002$). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do grupo controle negativo, com exceção da FOEE na concentração de 200 mg/kg.

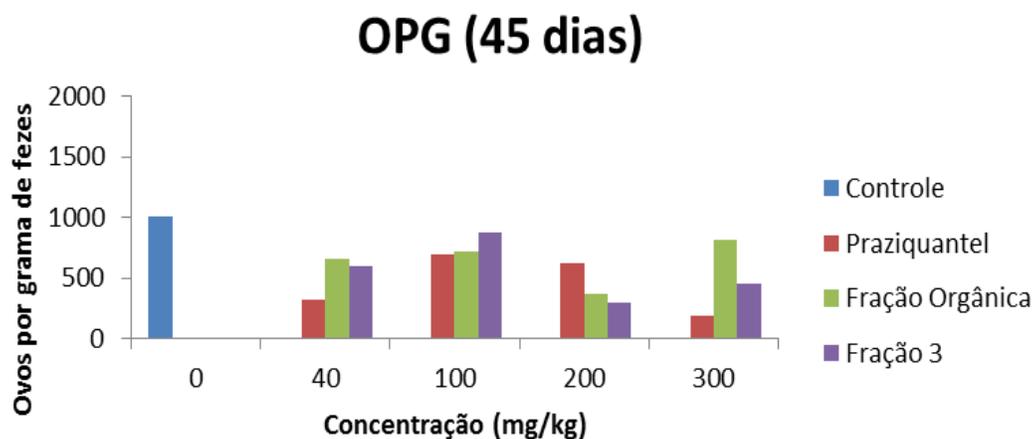
Em relação aos ovos mortos, não houve diferença significativa entre a quantidade desses, nos mesmos grupos de tratamento. Entre as diferentes concentrações testadas para uma mesma amostra, apenas a F3 apresentou diferença estatística (3,3 ovos - 40 mg/kg - e 27,2 ovos - 200 mg/kg - $p < 0,0001$). O grupo tratado com 200 mg/kg de FOEE, 3 e PZQ não tiveram diferença significativa na quantidade desses ovos em comparação ao grupo controle negativo.

Dessa forma, pode-se observar que os tratamentos realizados aos 60 dias de infecção demonstraram menor atividade para o parâmetro oograma. Isso porque as amostras testadas, assim como o PZQ, apresentaram altas porcentagens de ovos imaturos e maduros nas duas concentrações. O tratamento feito com 200 mg/kg de PZQ demonstrou ser mais eficiente que os outros por ter

apresentado menor porcentagem de ovos imaturos e maduros (25,6 e 33,4%, respectivamente) e maior de mortos (40,9%).

Comparando-se ambos os dias de tratamento para o parâmetro oograma, em relação aos ovos imaturos, não houve diferença significativa entre as concentrações e amostras testadas. Em contrapartida, o grupo controle negativo diferiu significativamente ($p = 0,0103$) nos grupos 45 e 60 dias, estando em maior quantidade no primeiro (46,3 e 18,1 ovos, respectivamente). Sobre os ovos maduros não houve diferença significativa entre os dois dias e para os ovos mortos houve diferença estatística apenas entre PZQ 200 mg/kg (5,7 e 19,9 ovos, e tratamento realizado aos 45 e 60 dias pós infecção, respectivamente, $p = 0,0215$).

A.



B.

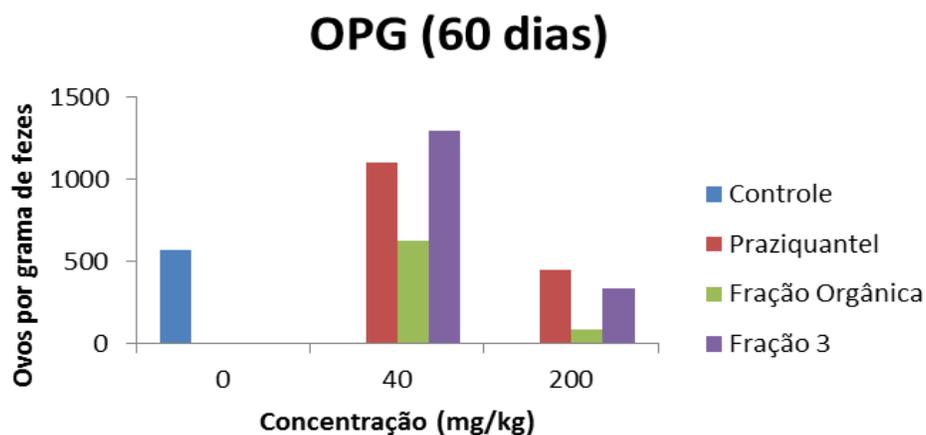


Figura 24. Avaliação da ação das FOEE e F3 - *in vivo* - sobre a oviposição de *S. mansoni*, comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg - não tratado) e com o PZQ. (A): Ovos por grama de fezes (OPG), em tratamentos realizados aos 45 dias de infecção. (B) Ovos por grama de fezes (OPG), em tratamentos realizados aos 60 dias de infecção.

RESULTADOS

Tabela 36: Efeito das diferentes concentrações de FOEE e F3 sobre a oviposição de *S. mansoni* - tratamentos realizados aos 45 dias de infecção.

45 dias Concentração (mg/kg)	Tratamento	OPG** $\bar{X} \pm D.P.$	Redução de ovos %	OOGRAMA***		
				IMATURO $\bar{X} \pm D.P. (%)$	MADURO $\bar{X} \pm D.P. (%)$	MORTOS $\bar{X} \pm D.P. (%)$
40	PZQ	316,7 ± 276,0 a	68,4	35,1 ± 39,7 (45,5) a	38,8 ± 30,1 (50,3) a b c	3,2 ± 4,3 (4,15)
	FOEE	663,6 ± 964,0	33,8	42,3 ± 41,9 (52,2) b	34,9 ± 31,1 (43,0) d e	3,8 ± 3,0 (4,7)
	F3	598,6 ± 738,6	40,3	12,6 ± 14,0 (21,2) c	36,8 ± 13,9 (62,0) f g	9,9 ± 9,4 (16,7) a
100	PZQ	688,8 ± 11267	31,3	20,0 ± 9,3 (37,3) d	28,8 ± 22,3 (53,3) h i	5,2 ± 7,4 (9,6)
	FOEE	720,0 ± 858,1	28,2	14,9 ± 7,1 (31,0) e	30,4 ± 22,4 (63,3) j k	2,7 ± 3,5 (5,6) b c
	F3	873,0 ± 877,1 b c	13	16,9 ± 13,8 (27,0) f	13,4 ± 10,7 (21,4) f l	32,3 ± 16,7 (51,6) a b e
200	PZQ	620,7 ± 705,9 d	38,1	14,8 ± 14,7 (44,7) g h	12,6 ± 9,3 (38,0) a m	5,7 ± 5,4 (17,2)
	FOEE	371,7 ± 322,7	63	15,5 ± 14,0 (27,6) i n	21,1 ± 14,0 (37,5) n	19,6 ± 20,8 (34,9) c
	F3	295,2 ± 371,4 b g	70,5	15,2 ± 11,7 (28,2) j	15,1 ± 6,5 (28,0) o	23,5 ± 15,9 (43,7) d
300	PZQ	188,8 ± 403,5 h	81,1	3,0 ± 9,4 (10,5) a g k	10,9 ± 10,5 (38,4) b h p	14,5 ± 17,2 (51,0)
	FOEE	811,3 ± 1588,1 e	19,1	10,1 ± 10,4 (40,2) b l	8,5 ± 6,6 (33,9) d g j r	6,5 ± 6,3 (25,9)
	F3	452,0 ± 663,9 f	54,9	9,3 ± 6,5 (24,1) m	13,3 ± 10,1 (34,5) q	15,9 ± 10,1 (41,3)
0	CONTROLE*	1003,4 ± 901,8 a c d e f g h	-	46,3 ± 31,7 (37,7) c d e f h i j k l m n	59,7 ± 30,2 (48,4) c e i k l m n o p q r	17,3 ± 7,8 (14,0) d e

*CONTROLE - Grupo Controle Negativo; **OPG - Ovos por grama de fezes; ***Estágios de maturidade dos ovos: 1° à 4° estágio - ovos imaturos; 5° estágio - ovos maduros; Letras iguais correspondem a diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05). D.P. – Desvio Padrão.

RESULTADOS

Tabela 37: Efeito das diferentes concentrações de FOEE e F3 sobre a oviposição de *S. mansoni* - tratamentos realizados aos 60 dias de infecção.

60 dias	Concentração (mg/kg)	Tratamento	OPG** \bar{X}	Redução de ovos %	OOGRAMA***		
					IMATURO \bar{X} (%)	MADURO \bar{X} (%)	MORTOS \bar{X} (%)
40		PZQ	1105,1 ± 892,4	-	44,4 ± 25,1 (39,9) a c	58,9 ± 20,4 (52,9) b f	8,0 ± 5,5 (7,2) b
		FOEE	625,5 ± 415,6 a b	-	21,7 ± 10,4 (36,4) c	26,7 ± 19,0 (44,8) h	11,2 ± 11,8 (18,8) c
		F3	1294,6 ± 1336,2 c	-	15,7 ± 10,2 (33,7)	27,5 ± 10,3 (59,1) e i	3,3 ± 4,9 (7,0) a d
200		PZQ	451,7 ± 655,1	20,5	12,5 ± 11,4 (25,6) a	16,3 ± 15,4 (33,4) a b c	19,9 ± 12,2 (40,9)
		FOEE	84,4 ± 154,4 a d	85,1	25,8 ± 19,0 (28,3)	37,1 ± 20,4 (40,8) a d	28,1 ± 18,2 (38,9)
		F3	335,7 ± 541,8 c	40,9	21,3 ± 15,9 (33,5) b	15,0 ± 14,3 (23,6) d e g	27,2 ± 11,4 (29,9) a
0		CONTROLE*	568,2 ± 465,4 b d	-	18,1 ± 16,4 (17,5) b	50,5 ± 34,5 (55,5) c c f g h i	34,8 ± 21,9 (38,2) b c d

*CONTROLE - Grupo Controle Negativo; **OPG - Ovos por grama de fezes; ***Estágios de maturidade dos ovos: 1° à 4° estágio - ovos imaturos; 5° estágio - ovos maduros; Letras iguais correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

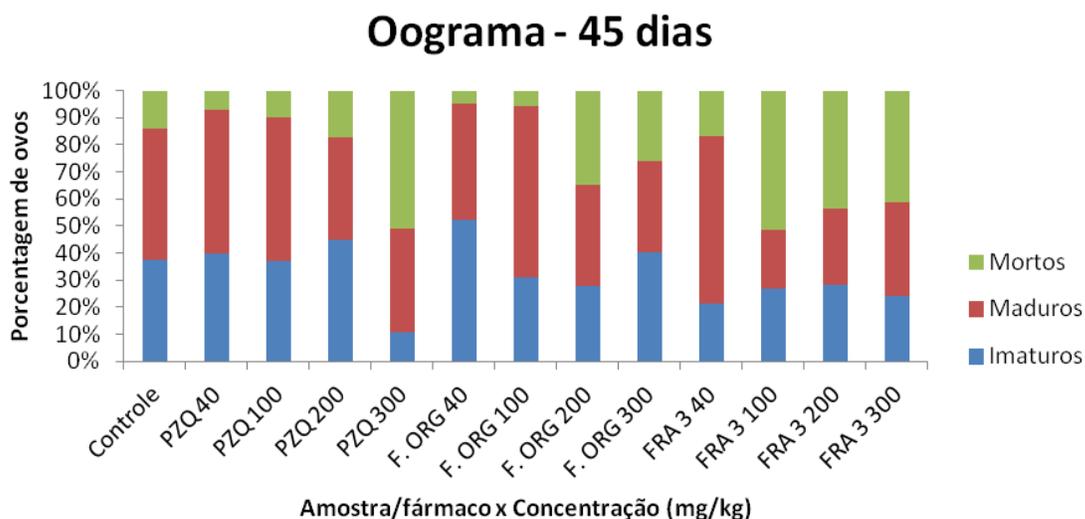


Figura 25. Avaliação da ação das FOEE e F3 - *in vivo* - sobre a viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg - não tratado) e com o PZQ. Tratamento realizado aos 45 dias de infecção. PZQ 40, 100, 200 e 300: PZQ 40, 100, 200 e 300 mg/kg; F. ORG 40, 100, 200 e 300: FOEE 40, 100, 200 e 300 mg/kg; FRA 3 40, 100, 200 e 300: F3 40, 100, 200 e 300 mg/kg.

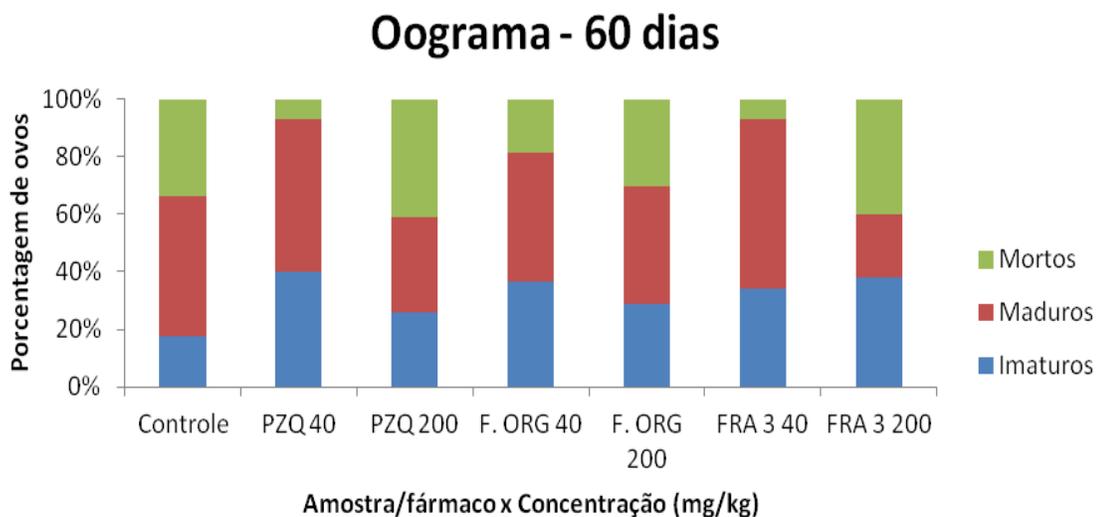


Figura 26. Avaliação da ação das FOEE e F3 - *in vivo* - sobre a viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, comparadas com a do grupo controle negativo (0 mg/kg - não tratado) e com o PZQ. Tratamento realizado aos 60 dias de infecção. PZQ 40, 100, 200 e 300: PZQ 40, 100, 200 e 300 mg/kg; F. ORG 40, 100, 200 e 300: FOEE 40, 100, 200 e 300 mg/kg; FRA 3 40, 100, 200 e 300: F3 40, 100, 200 e 300 mg/kg.

5.3.2.2 Ação das FOEE e F3 nas reações granulomatosas provocadas pelos ovos de *S. mansoni*

A ação das FOEE e F3 sobre as reações granulomatosas produzidas em resposta aos ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos foi avaliada por meio de observações histológicas dos principais órgãos acometidos pelos granulomas: fígado, intestino, baço e pulmão.

Foi observado que a FOEE diferiu significativamente do grupo controle negativo (12,6 granulomas por cm^2) em relação à quantidade média de granulomas, nos tratamentos realizados aos 45 dias de infecção (tabelas 38 e 39), em todos os órgãos analisados (figura 27), com as concentrações de 40 (fígado: 6,0 granulomas por cm^2 ; intestino: 1,3; baço e pulmão: 0,0; $p = 0,0493$), 100 (fígado: 7,0 granulomas por cm^2 ; intestino: 2,0; baço e pulmão: 0,0; $p = 0,0493$) e 300 mg/kg (fígado: 3,0 granulomas por cm^2 ; intestino: 1,3; baço e pulmão: 0,0; $p = 0,0278$). A F3 e o PZQ não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle.

Aos 60 dias de infecção (tabelas 37 e 38; figuras 28), a FOEE diferiu significativamente do grupo controle (13,6 granulomas por cm^2), para esse mesmo parâmetro, com ambas as concentrações (40 mg/kg: 12,6 granulomas por cm^2 , $p = 0,045$; 200 mg/kg: 8,6, $p = 0,0178$). Os demais tratamentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle com a concentração de 200 mg/kg (PZQ: 3,0 granulomas por cm^2 , $p = 0,0013$; F3: 9,3, $p = 0,0035$).

Em relação às medidas dos granulomas, nos tratamentos realizados aos 45 dias de infecção, diferenças estatísticas entre o grupo tratado e o controle ($51310,3 \text{ mm}^2$) foram encontradas com a FOEE na concentração de 40 mg/kg ($40721,1 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) e 200 mg/kg ($28749,4 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) e a F3, 200 mg/kg ($25,996 \text{ mm}^2$; $p < 0,01$). Nos tratamentos realizados no 60º dia de infecção, diferiram significativamente do grupo controle e PZQ ($45662,2$; $p < 0,05$) e a F3 ($35185,2$; $p < 0,05$), na concentração de 40 mg/kg.

De acordo com esses resultados, pode-se afirmar que a FOEE foi a que se mostrou mais ativa em relação à diminuição da quantidade de granulomas hepáticos e nos demais tecidos, nos tratamentos realizados no 45º dia de infecção, já que foi o único grupo a diferir significativamente do controle negativo, apresentando menor quantidade dessas reações nos órgãos analisados. Aos 60 dias de infecção, os tratamentos realizados com a concentração de 200 mg/kg mostraram-se mais eficazes que a de 40 mg/kg, já que todos os grupos tratados demonstraram menor quantidade significativa de granulomas nos órgãos analisados que o grupo controle negativo, destacando-se o PZQ para os granulomas hepáticos, a F3 para os intestinais, a FOEE para os esplênicos e a F3 para os pulmonares.

Assim pode-se afirmar que as FOEE e F3 apresentaram atividade na formação dos granulomas, principalmente quando administradas aos 45 dias de infecção, diminuindo sua quantidade e tamanho.

Analisando-se os resultados em conjunto, pode-se afirmar que o melhor tratamento para as reações granulomatosas foi o efetuado com 200 mg/kg de FOEE (prancha 1), pois apresentou menor quantidade de granulomas que o grupo controle negativo - em todos os órgãos analisados e em ambos os dias de tratamento - e, apesar de não diferirem estatisticamente nos realizados aos 45 dias, essas diferenças foram consideradas biologicamente importantes. Além disso, também apresentou granulomas menores que o grupo controle negativo.

Foi também possível observar diferenças nas reações granulomatosas entre os dois dias de tratamento para todos os grupos, uma vez que aos 60 dias esses foram encontrados em maior quantidade, porém, apresentando menor área, em relação aos granulomas hepáticos.

Tabela 38: Ação das FOEE e F3 sobre o granuloma hepático.

Concentração (mg/kg)		45 dias		60 dias	
		Quantidade de Granulomas	Área dos Granulomas (mm ²)	Quantidade de Granulomas	Medida dos Granulomas (mm ²)
		$\bar{X} \pm \text{D.P.}$	$\bar{X} \pm \text{D.P.}$	$\bar{X} \pm \text{D.P.}$	$\bar{X} \pm \text{D.P.}$
40	PZQ	5,6 ± 5,0	45662,2 ± 34184,0	13,3 ± 2,8	28892,8 ± 12474,1 f
	FOEE	6,0 ± 3,0 a	40721,1 ± 26688,6 d	12,6 ± 3,0 a	34804,2 ± 16841,1
	F3	10,0 ± 2,6	35185,2 ± 16966,3	12,6 ± 2,0	30874,9 ± 18327,8 e
100	PZQ	6,0 ± 0,6	44329,3 ± 22207,8	-	-
	FOEE	7,0 ± 1,0 b	27820,0 ± 11785,2	-	-
	F3	7,6 ± 4,0	45509,3 ± 20598,2	-	-
200	PZQ	6,0 ± 4,1	51776,5 ± 31569,0 e g	3,0 ± 5,2 d	33756,9 ± 11190,2
	FOEE	5,6 ± 2,9	28749,4 ± 12275,0 e f	8,6 ± 3,7 b	30313,8 ± 14362,7
	F3	7,3 ± 0,5	25996,6 ± 10253,9 g h	9,3 ± 4,9 c	36908,2 ± 11127,1
300	PZQ	9,6 ± 2,5	40431,5 ± 21281,8	-	-
	FOEE	3,0 ± 5,2 c	41852,0 ± 19867,5	-	-
	F3	5,6 ± 4,9	34398,8 ± 23388,2	-	-
0	CONTROLE*	12,6 ± 4,0 a b c i	51310,3 ± 28405,2 d f h	13,6 ± 2,0 a b c d i	42773,8 ± 24065,9 e f

*CONTROLE - Grupo controle negativo: Letras iguais correspondem à grupos que diferiram significativamente (p < 0,05) entre si. D.P. - Desvio Padrão.

RESULTADOS

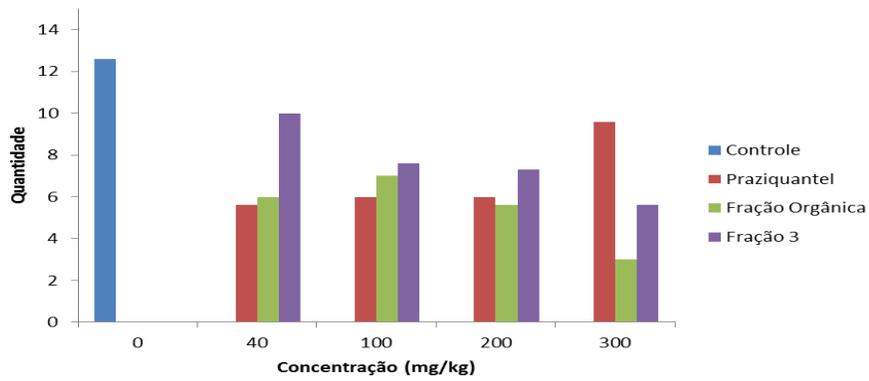
Tabela 39. Ação das FOEE e F3 sobre a quantidade de granulomas no intestino, baço e pulmão.

Concentração (mg/kg)		45 dias			60 dias		
		Granulomas			Granulomas		
		Intestino	Baço	Pulmão	Intestino	Baço	Pulmão
		$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$
40	PZQ	3,0 ± 2,6	0,3 ± 1,7	1,0 ± 2,8	19,3 ± 0,5	1,6 ± 2,8	2,3 ± 2,5
	FOEE	1,3 ± 1,1 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	16,3 ± 11,5 a	0,0 ± 0,0 a	3,0 ± 2,6 a
	F3	2,6 ± 3,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	15,0 ± 3,6	4,0 ± 4,0	2,0 ± 1,0
100	PZQ	6,6 ± 2,6	8,0 ± 1,7	1,6 ± 2,9	-	-	-
	FOEE	2,0 ± 3,4 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	-	-	-
	F3	6,3 ± 4,0	0,0 ± 6,6	0,0 ± 0,0	-	-	-
200	PZQ	3,0 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,3 ± 6,5 d	0,6 ± 1,1 d	1,0 ± 1,0 d
	FOEE	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	13,3 ± 8,0 b	0,0 ± 0,0 b	1,0 ± 2,0 b
	F3	10,6 ± 2,3	0,0 ± 0,0	4,0 ± 6,0	8,0 ± 5,0 c	1,3 ± 2,3 c	0,0 ± 0,0 c
300	PZQ	8,6 ± 10,7	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	-	-	-
	FOEE	1,3 ± 1,1 c	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c	-	-	-
	F3	10,6 ± 2,3	0,0 ± 0,0	4,0 ± 6,0	-	-	-
0	CONTROLE	15,0 ± 4,5 a b c i	0,6 ± 0,5 a b c i	0,3 ± 0,6 a b c i	18,3 ± 1,5 a b c d i	10,0 ± 2,0 a b c d i	10,6 ± 9,8 a b c d i

*CONTROLE - Grupo controle negativo: Letras iguais correspondem à grupos que diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre o grupo controle. D.P. – Desvio Padrão.

A.

Granulomas hepáticos (45 dias)



B.

Granulomas intestinais, esplênicos e pulmonares (45 dias)

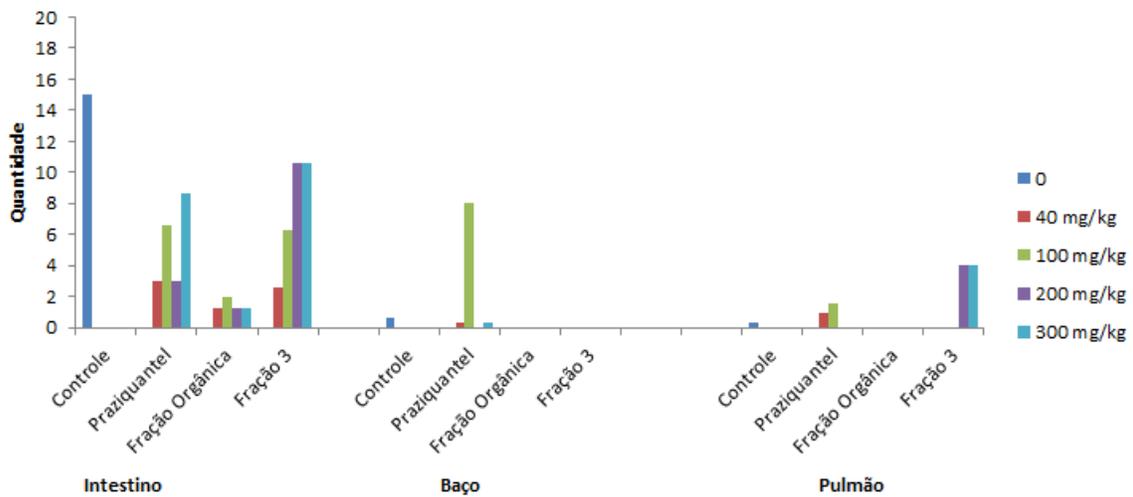
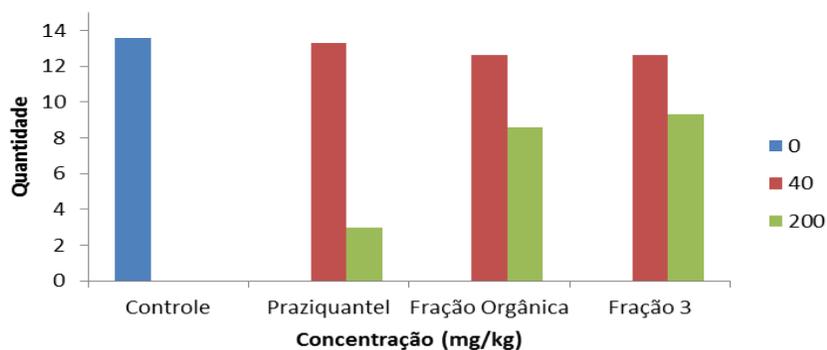


Figura 27: (A) e (B): Média de granulomas hepáticos, intestinais, esplênicos e pulmonares em tratamentos realizados aos 45 dias de infecção..

A.

Granulomas hepáticos (60 dias)



B.

Granulomas intestinais, esplênicos e pulmonares (60 dias)

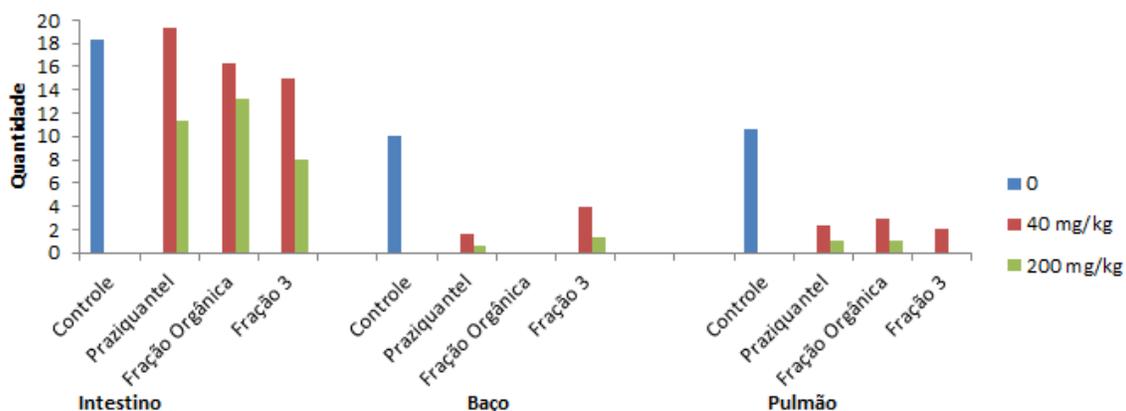
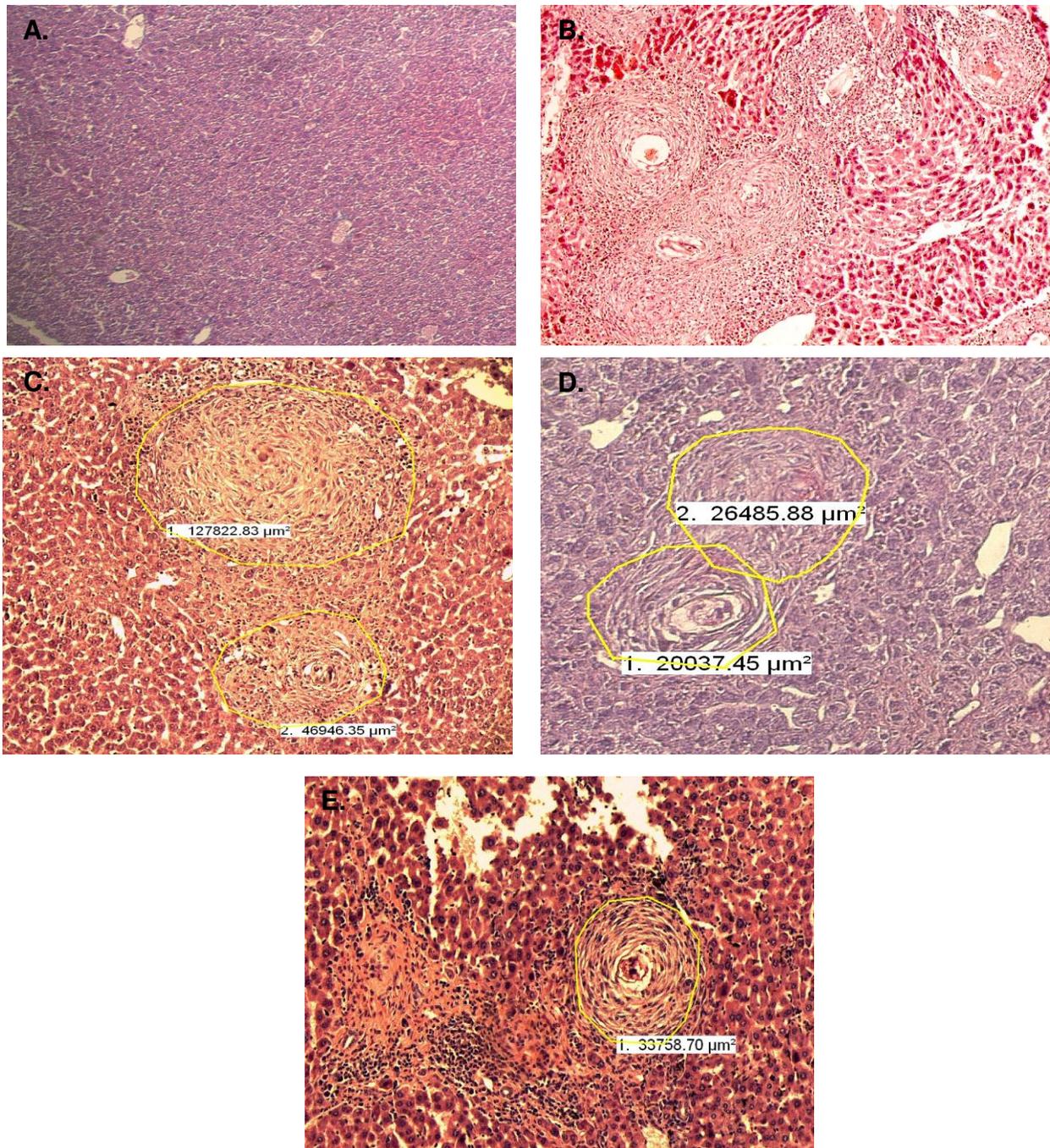


Figura 28: (A) e (B): Média de granulomas hepáticos, intestinais, esplênicos e pulmonares em tratamentos realizados aos 60 dias de infecção.



Prancha 1. Granulomas hepáticos. Tratamentos realizados aos 45 dias de infecção com 200 mg/kg de PZQ, FOEE ou F3. (A): fígado de animal sadio. (B): fígado do grupo controle infectado e não submetido ao tratamento. (C): fígado submetido a tratamento com PZQ. (D) e (E): fígados submetidos a tratamento com FOEE e F3, respectivamente, mostrando granulomas menores em comparação aos grupos PZQ e controle. Escala: 100 μm

5.3.3 Relação entre a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, OPG e quantidade de granulomas hepáticos.

Relacionando-se os parâmetros vermes recuperados do sistema porta-hepático, OPG e a quantidade dos granulomas hepáticos pode-se observar que nos tratamentos realizados aos 45 dias de infecção (figura 29):

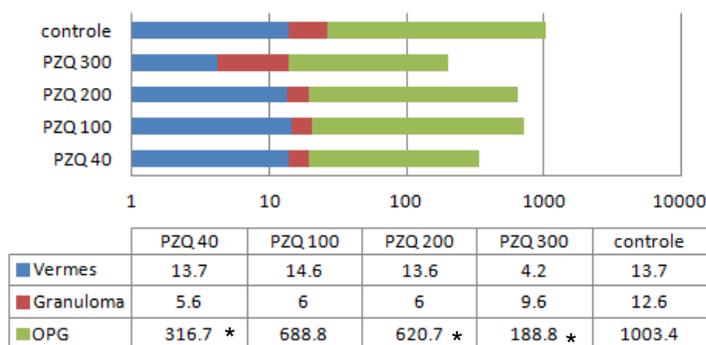
- o grupo PZQ na medida em que se aumentou a concentração testada, aumentou também a quantidade média de granulomas hepáticos, ou seja, de ovos retidos no fígado (40 mg/kg: 5,6 granulomas por cm^2 ; 100 e 200 mg/kg: 6,0 e 300 mg/kg - 9,6), porém diminuiu a quantidade de ovos eliminados para o ambiente com as fezes (40 mg/kg: 316,7 ovos/grama de fezes; 100 mg/kg: 688,8; 200 mg/kg: 620,7 e 300 mg/kg: 188,8). Conforme os três parâmetros analisados nesse tópico acredita-se que o melhor tratamento para o PZQ foi o realizado na concentração de 300 mg/kg, pois apesar de apresentar maior quantidade de granulomas que as demais, teve menores OPG e vermes recuperados por perfusão do sistema porta-hepático.

- com a FOEE, a concentração mais ativa para diminuição da quantidade de granulomas hepáticos (300 mg/kg) foi a que apresentou maior OPG sendo possível inferir que poucos foram os ovos retidos no tecido hepático, tendo sido a maioria eliminados com as fezes. De acordo com os resultados obtidos para esses parâmetros pode-se avaliar que a concentração de 200 mg/kg representou o melhor tratamento para esta fração, isso porque teve uma das menores quantidades de granulomas, menor OPG e quantidade de vermes recuperados parecida (não diferindo significativamente) com as outras.

- com a F3, as concentrações mais altas (200 e 300 mg/kg) foram as que apresentaram maior quantidade de vermes recuperados por perfusão do sistema porta-hepático. Em contrapartida, tiveram menor OPG. Como a quantidade de granulomas foi parecida (não diferindo significativamente) em comparação às concentrações testadas, pode-se afirmar que o melhor tratamento com essa fração e para esses três parâmetros foi a de 200 mg/kg, já que apresentou a menor OPG.

A.

Praziquantel



B.

***C. verbenacea*: FOEE**



C.

***C. verbenacea*: F3**



Figura 29. (A) (B) e (C): Relação entre os tratamentos (efetuados aos 45 dias de infecção) e suas concentrações testadas, com a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, ovos por grama de fezes e granulomas hepáticos. PZQ 40, 100, 200 e 300 - PZQ nas concentrações de 40, 100, 200 e 300 mg/kg; f org 40, 100, 200 e 300 - FOEE nas concentrações de 40, 100, 200 e 300 mg/kg; fra 3 40, 100, 200 e 300 - F3 nas concentrações de 40, 100, 200 e 300 mg/kg; OPG - ovos por grama de fezes; Granuloma - quantidade média de granulomas hepáticos por cm²; Vermes - quantidade média de vermes recuperados do sistema porta-hepático; controle - grupo controle negativo. * p < 0,05 em relação ao grupo Controle.

Para os tratamentos realizados aos 60 dias e infecção (figura 30) pode-se observar que:

- o grupo PZQ apresentou menores quantidades de vermes recuperados pela perfusão do sistema porta-hepático, reações granulomatosas no tecido hepático e ovos por grama de fezes na concentração de 200 mg/kg, tendo sido esta a mais ativa para esses parâmetros, neste dia de tratamento.

- a FOEE, na concentração de 200 mg/kg, teve quantidade parecida de vermes recolhidos do sistema porta-hepático em comparação à de 40 mg/kg (valores não significativos estatisticamente), menor quantidade de granulomas hepáticos (estatisticamente não significativo, porém biologicamente importante) e de ovos por grama de fezes, sendo considerada a concentração mais ativa para esses parâmetros, neste dia de tratamento.

- a F3, na concentração 200 mg/kg, apresentou menor quantidade de vermes recuperados no sistema porta-hepático, granulomas hepáticos e ovos por grama de fezes, sendo esta também a concentração mais ativa para esses parâmetros, neste dia de tratamento.

Tratamentos realizados 60 dias pós infecção

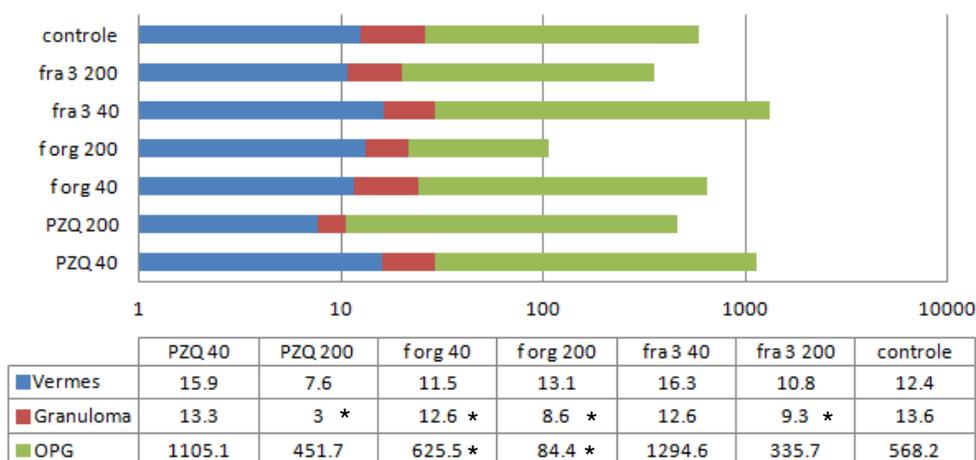


Figura 30. Relação entre os tratamentos (efetuados aos 60 dias de infecção) e suas concentrações testadas, com a quantidade de vermes recuperados do sistema porta-hepático, ovos por grama de fezes e granulomas hepáticos. PZQ - PZQ; f org - FOEE; fra 3 - F3; OPG - ovos por grama de fezes; Granuloma - quantidade média de granulomas hepáticos por cm²; Vermes - quantidade média de vermes recuperados do sistema porta-hepático. * p < 0,05 em relação ao grupo Controle.

Para os dois dias de tratamento, a concentração de 200 mg/kg mostrou-se mais ativa que as demais para os três parâmetros aqui analisados. Ainda sobre esses parâmetros os tratamentos realizados aos 45 dias de infecção apresentaram-se mais ativos para a maioria deles, mesmo que certas quantidades de vermes, granulomas ou ovos não tenham diferido significativamente entre as concentrações, tratamentos ou grupo controle. Apesar disso, o tratamento efetuado 60 dias pós infecção com 200 mg/kg de FOEE demonstrou redução acentuada na OPG em comparação às amostras testadas.

5.3.4 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal e hepatoesplenomegalia.

A ação das FOEE e F3 sobre ganho ou perda de peso dos camundongos e a hepatoesplenomegalia foram analisadas após 15 dias da administração do tratamento. Dessa forma, os camundongos foram pesados, em seguida eutanaziados, retirados o fígado e baço que foram também pesados separadamente.

Aos 45 dias de infecção (tabela 40 e figura 31) houve diferença significativa entre: o PZQ e a F3, em relação ao peso corporal médio dos camundongos, com as concentrações de 200 (23,4 e 20,8 g, respectivamente, $p = 0,0142$) e 300 mg/kg (23,6 e 21,7, respectivamente, $p = 0,0177$); FOEE e F3 na concentração de 300 mg/kg (23,7 e 21,7, respectivamente, $p = 0,0066$).

Diferiram significativamente do grupo controle negativo - infectado porém não tratado -, com peso médio de 22,7 g, a F3 nas concentrações de 100 (21,2 g, $p = 0,0229$) e 200 mg/kg (20,8 g, $p = 0,0452$). Essa mesma fração, nessas mesmas concentrações, também diferiu significativamente (100 - $p = 0,0174$ - e 200 mg/kg - $p = 0,0295$) do grupo de camundongos sadios não infectados (peso médio de 23,4 g). Não houve diferença significativa para o peso corporal médio dos camundongos entre os demais tratamentos e os grupos controles (infectados e sadios) assim como não foi estatisticamente significativa a comparação entre o peso médio dos camundongos infectados, mas não tratados com os sadios.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos com os tratamentos efetuados nesse período, pode-se inferir que com a F3 houve a perda de peso dos camundongos. Os demais tratamentos não provocaram alterações significativas no peso corporal em relação aos grupos controles.

O peso médio do fígado e do baço dos camundongos submetidos aos tratamentos após 45 dias de infecção, além do grupo controle infectado não tratado, diferiu significativamente dos camundongos sadios, indicando ocorrência de hepatoesplenomegalia em todos os grupos.

Tratamentos realizados nesse mesmo período com a concentração de 100 mg/kg apresentaram diferença significativa em relação ao peso médio do baço entre os grupos tratados com PZQ (0,6 g) e FOEE (0,4 g, $p = 0,0404$) e entre essa e a F3 (0,7 g, $p = 0,0056$).

Comparando-se os grupos tratados com o controle infectado e não submetido a tratamento, houve diferença significativa para o peso do baço apenas com a FOEE, na concentração de 40 mg/kg (0,5 e 0,7 g, respectivamente, $p = 0,0222$).

Conforme esses resultados, pode-se observar que a FOEE apresentou-se mais ativa para diminuição da esplenomegalia, uma vez que o peso do baço, embora nem sempre estatisticamente significativo, foi menor em comparação à maioria dos tratamentos e suas respectivas concentrações. Além disso, a concentração de 100 mg/kg diferiu significativamente entre os feitos no mesmo grupo, sendo menor que os demais.

Para os tratamentos realizados após 60 dias de infecção (tabela 41 e figura 32), houve diferença significativa ($p = 0,0136$) no peso médio dos camundongos entre o mesmo grupo de tratamento com a concentração de 200 mg/kg de FOEE (24,4 g) e 3 (22,2 g). Os feitos com 40 mg/kg apresentaram diferença significativa em relação aos camundongos sadios e esses, por sua vez, diferiram estatisticamente do grupo controle infectado e não tratado.

Assim, pode-se afirmar que para o parâmetro peso corporal os tratamentos mais ativos, realizados aos 60 dias de infecção, foram os efetuados com a concentração de 200 mg/kg, pois não apresentaram-se diferentes estatisticamente do grupo de camundongos sadios. Em especial, a FOEE foi a que mais se aproximou do peso dos camundongos sadios (24,4 e 24,5 g, respectivamente).

O peso médio do fígado dos camundongos tratados nesse mesmo dia com 200 mg/kg de PZQ (1,7 g) e FOEE (2,0 g) diferiram significativamente ($p = 0,0175$) entre si. Os demais tratamentos (com exceção da F3, 200 mg/kg) e o

grupo controle infectado, mas não tratado, diferiram significativamente dos camundongos saudáveis.

Em relação a hepatomegalia pode-se afirmar que os tratamentos mais ativos, quando realizados aos 60 dias pós infecção, foram os feitos com a F3 (1,6 g) e o PZQ, pois não houve diferença significativa para o peso médio do fígado entre esses e os camundongos saudáveis.

Houve diferença significativa para o peso médio do baço nos tratamentos realizados com a concentração de 40 mg/kg entre o PZQ (0,9 g) e a F3 (1,0 g, $p = 0,0152$), com 200 mg/kg de PZQ (0,6 g) e FOEE (0,9 g, $p = 0,0187$) e desta e a F3 (0,6 g, $p = 0,0069$).

Dessa forma, aos 60 dias de infecção, a esplenomegalia foi menor nos tratamentos realizados com 200 mg/kg em especial o PZQ (40 mg/kg - 0,9 g - enquanto que 200 mg/kg - 0,6 g; $p = 0,0008$).

Comparando-se os dois dias de tratamento, houve diferença significativa em relação ao peso médio dos camundongos nos tratamentos realizados com 200 mg/kg de FOEE (22,5 g - aos 45 dias - e 24,4 g - aos 60 dias-, $p = 0,0325$) e para o peso do baço nos feitos com 40 mg/kg de PZQ (0,7 g - aos 45 dias - e 0,9 - aos 60 dias -, $p = 0,0048$).

De um modo geral percebe-se aumento de peso corporal, baço e fígado (nem sempre significativos) para a maioria dos tratamentos realizados aos 60 dias de infecção, em comparação aos de 45 dias.

Tabela 40. Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal, do fígado e baço dos camundongos em tratamento feito aos 45 dias de infecção.

45 dias		Peso (g)				
		Camundongo	Fígado	% Peso fígado/Peso corporal	Baço	% Peso baço/Peso corporal
Concentração (mg/kg)		$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	%	$\bar{X} \pm D.P.$	%
40	PZQ	23,2 ± 1,7	1,9 ± 0,2 a	8,1	0,7 ± 0,1 a	3,0
	FOEE	22,7 ± 2,0	1,7 ± 0,3 b	7,4	0,5 ± 0,2 b	2,2
	F3		21,4 ± 2,6		1,8 ± 0,1 c	
100	PZQ	23,5 ± 1,4	1,8 ± 0,1 d	7,6	0,6 ± 0,1 d e	2,5
	FOEE	20,6 ± 7,4	1,6 ± 0,6 e	7,7	0,4 ± 0,2 d f	1,9
	F3		21,2 ± 0,7 a b		1,8 ± 0,1 f	
200	PZQ	23,4 ± 1,4 c	1,8 ± 0,1 g	7,6	0,7 ± 0,0 h	2,9
	FOEE	22,5 ± 1,4	1,8 ± 0,1 h	8,0	0,6 ± 0,1 i	2,6
	F3		20,8 ± 2,1 c d e		1,6 ± 0,2	
300	PZQ	23,6 ± 1,6 f	1,8 ± 0,2 i	7,6	0,7 ± 0,1 k	2,9
	FOEE	23,7 ± 1,8	1,7 ± 0,2 j	7,1	0,6 ± 0,1 l	2,5
	F3		21,7 ± 0,8 f g		1,6 ± 0,4 k	
0	CONTROLE	22,7 ± 1,8 a d	1,9 ± 0,2 l	8,3	0,7 ± 0,2 b n	3,0
0	SADIO	23,4 ± 1,3 b e	1,3 ± 0,0 a b c d e f g h i j k l	5,5	0,2 ± 0,1 a c e g h i j k l m n	0,4

CONTROLE - grupo controle negativo (infectado porém "tratado" apenas com solução PBS); SADIO - grupo controle não infectado; Letras iguais indicam diferenças significativas (p< 0,05) entre si. D.P. – Desvio Padrão.

Tabela 41. Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal, do fígado e baço dos camundongos em tratamento feito aos 60 dias de infecção.

60 dias		Peso (g)				
		Camundongo	Fígado	% Peso fígado/Peso corporal	Baço	% Peso baço/Peso corporal
Concentração (mg/kg)		$\bar{X} \pm D.P.$	$\bar{X} \pm D.P.$	%	$\bar{X} \pm D.P.$	%
40	PZQ	24,0 ± 1,4 b	1,9 ± 0,2 c	7,9	0,9 ± 0,2 b g h i	3,7
	FOEE	23,9 ± 1,6 c	2,0 ± 0,1 d	8,3	1,0 ± 0,2 j	4,1
	F3	23,3 ± 2,1 d	2,0 ± 0,2 e	8,5	1,0 ± 0,2 g k	4,2
200	PZQ	23,6 ± 2,1	1,7 ± 0,2 a	7,2	0,6 ± 0,1 a b c	2,5
	FOEE	24,4 ± 1,3 a	2,0 ± 0,2 a b	8,1	0,9 ± 0,1 a d e	3,6
	F3	22,2 ± 1,9 a	1,6 ± 0,1	7,2	0,6 ± 0,1 d f	2,7
0	CONTROLE	23,6 ± 1,3 e	1,9 ± 0,2 f	8,0	0,8 ± 0,2 h i	3,3
0	SADIO	24,5 ± 0,3 b c d e	1,4 ± 0,2 b c d e f	5,7	0,3 ± 0,07 c e f i j k l	1,2

CONTROLE - grupo controle negativo (infectado porém "tratado" apenas com solução PBS); SADIO - grupo controle não infectado. Letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). D.P. – Desvio Padrão.

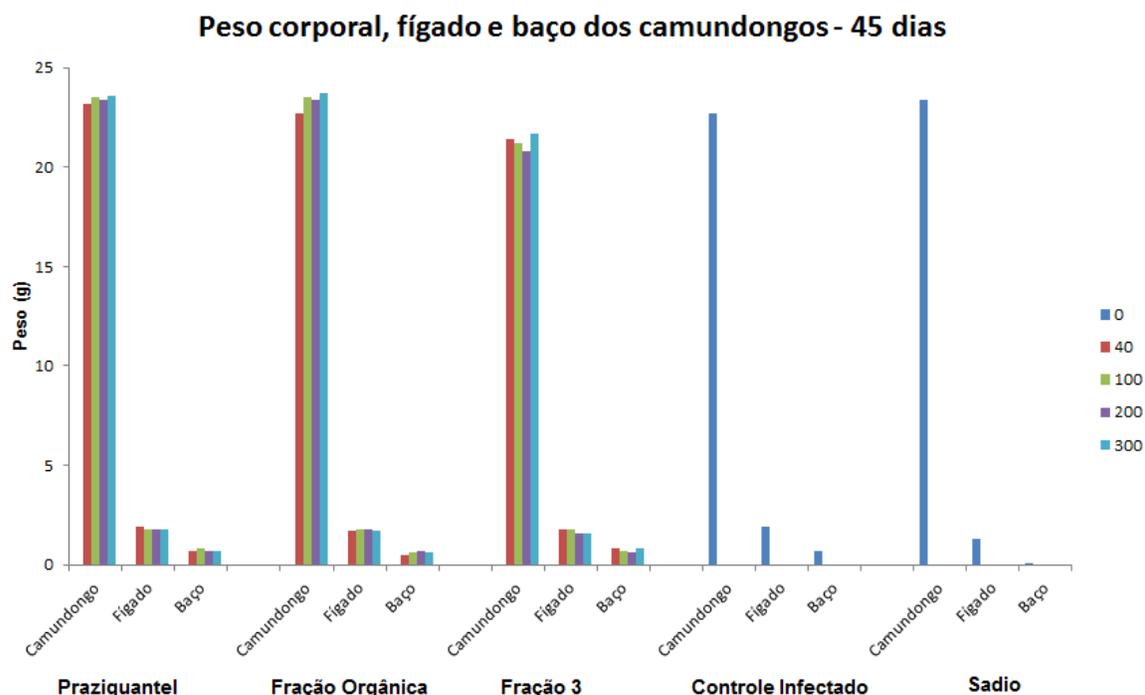


Figura 31. Peso médio corporal, do fígado e do baço de camundongos submetidos a diferentes tratamentos, aos 45 dias de infecção.

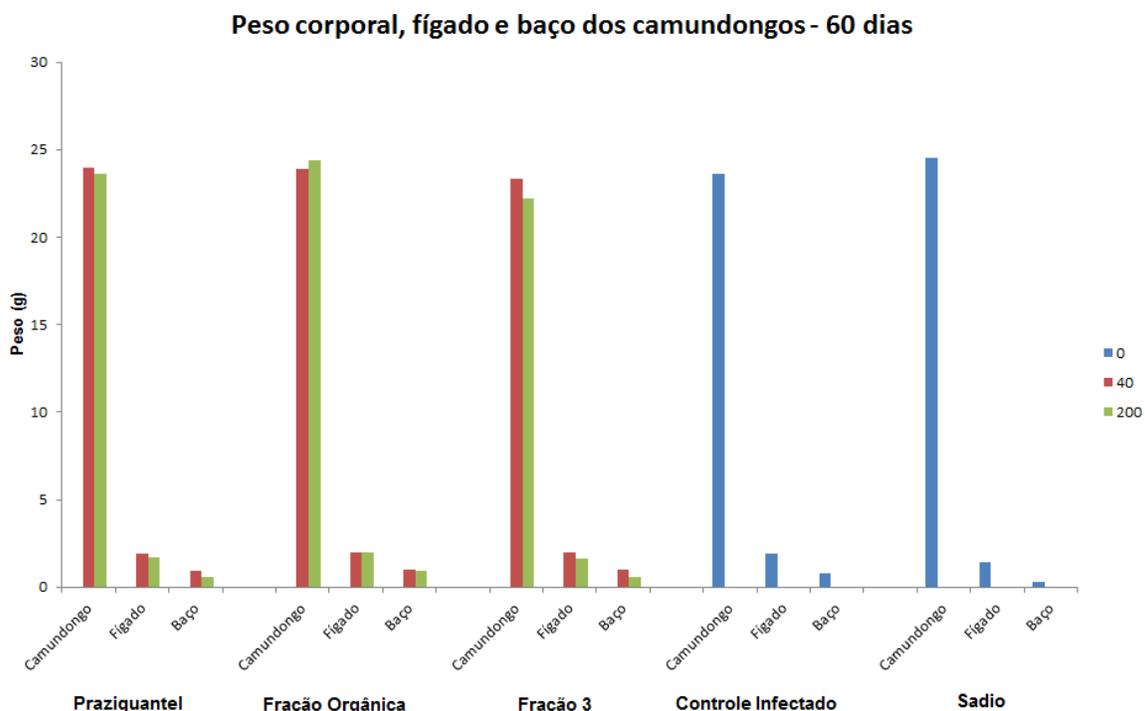


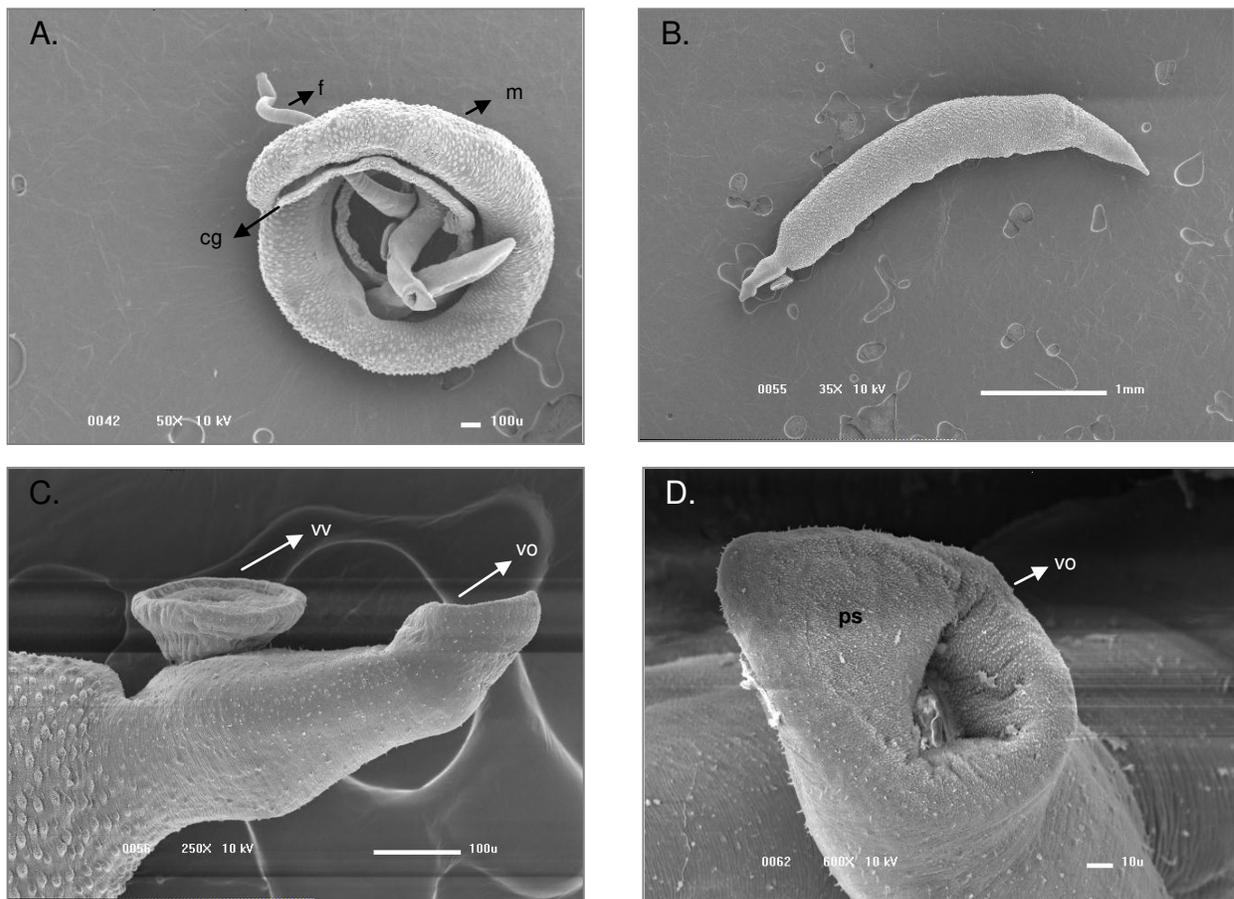
Figura 32. Peso médio corporal, do fígado e do baço de camundongos submetidos a diferentes tratamentos, aos 60 dias de infecção.

5.3.5 Ação das FOEE e F3 sobre o tegumento de adultos de *S. mansoni* após ensaios *in vivo*.

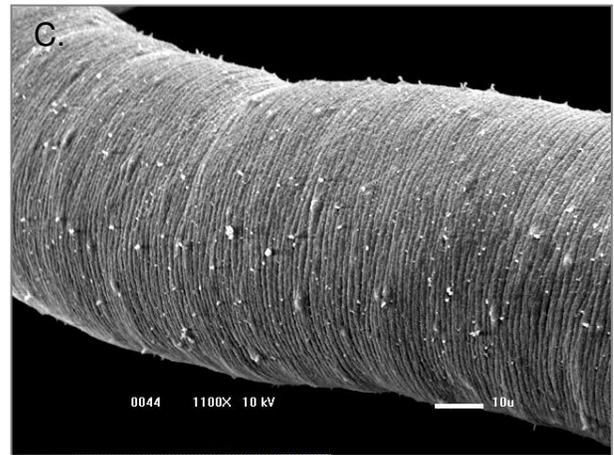
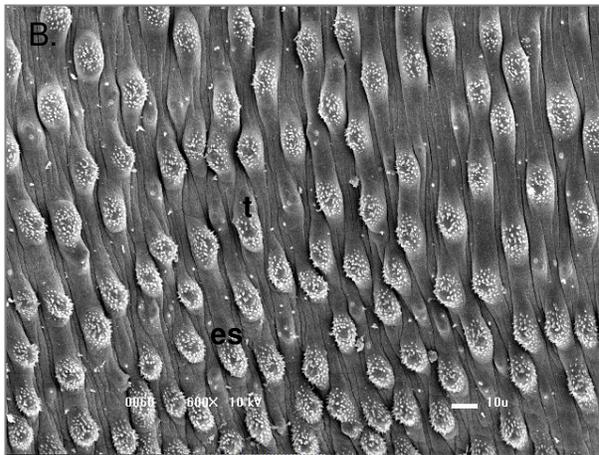
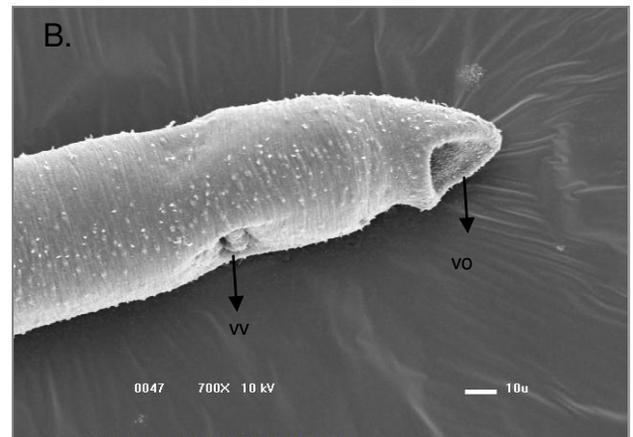
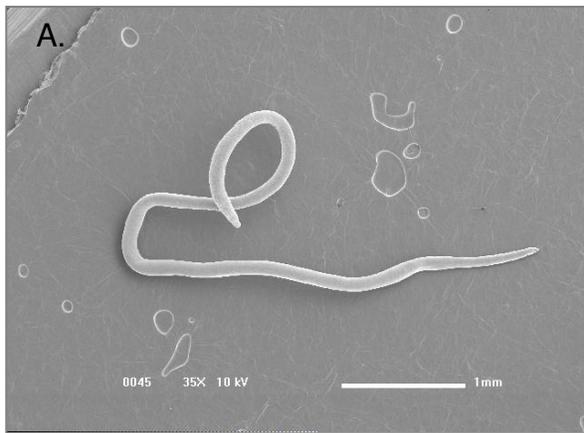
A avaliação da atividade das FOEE e F3 sobre o tegumento de *S. mansoni* foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura, após recuperação dos mesmos por meio de perfusão do sistema porta-hepático de camundongos infectados há 45 dias e tratados com 300 mg/kg das frações. As imagens obtidas foram comparadas com as dos vermes recuperados de animais do grupo controle negativo (não tratado – pranchas 2 e 3) e positivo (tratados com PZQ) nessa mesma concentração.

Foi possível observar alterações destruição de tubérculos com perda de espinhos, formação de vesículas, erosão além da adesão de células do hospedeiro, em especial de leucócitos, nos tegumentos dos vermes machos recuperados de camundongos tratados com as FOEE e F3 (pranchas 4 e 5). As fêmeas recuperadas de camundongos tratados com a F3 apresentaram erosão do tegumento (prancha 6).

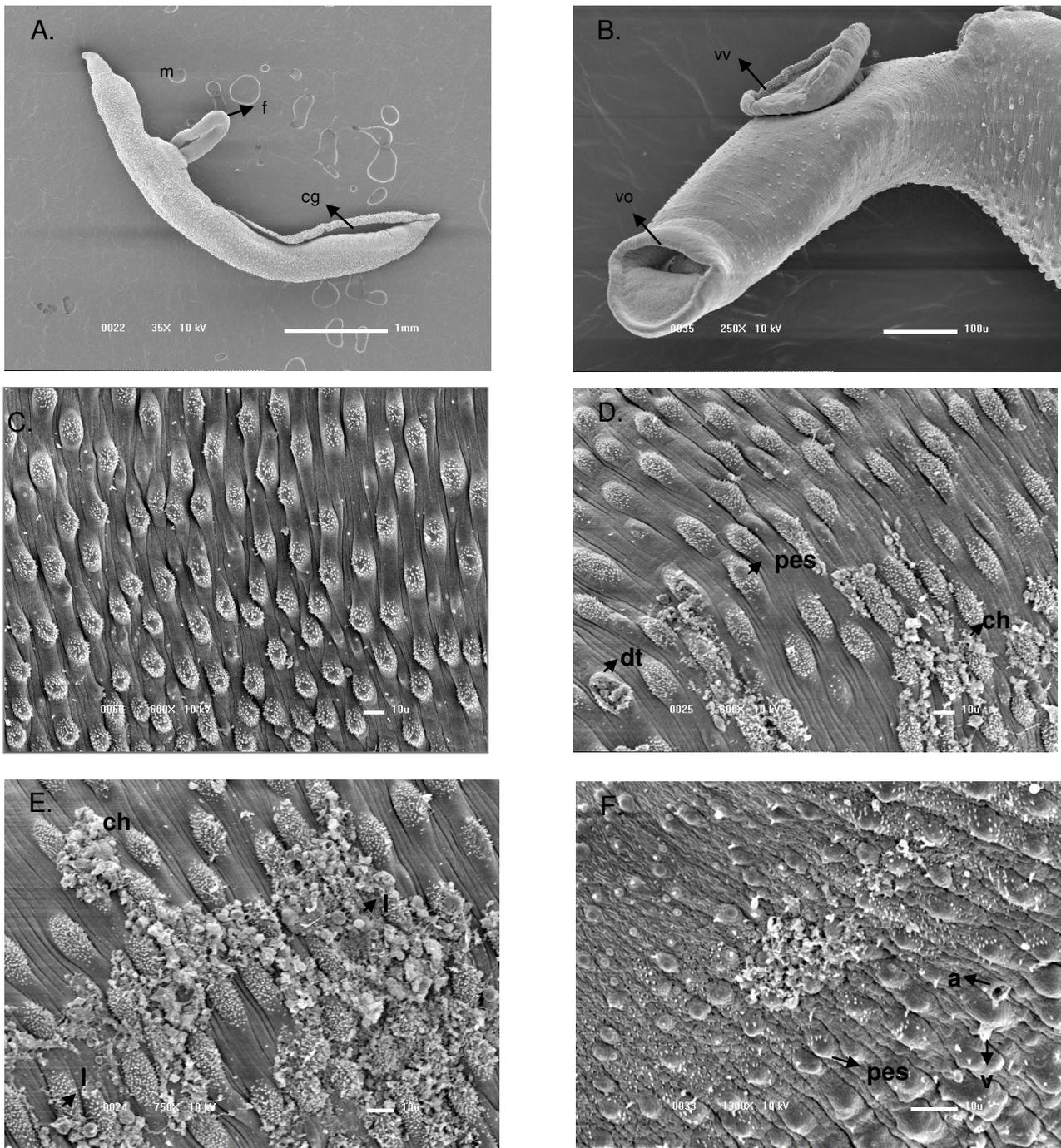
As alterações observadas com as frações foram mais extensas que as demonstradas pelo PZQ. Nesse caso, observou-se apenas a adesão de células do hospedeiro (leucócitos) no tegumento dos machos (pranchas 7 e 8).



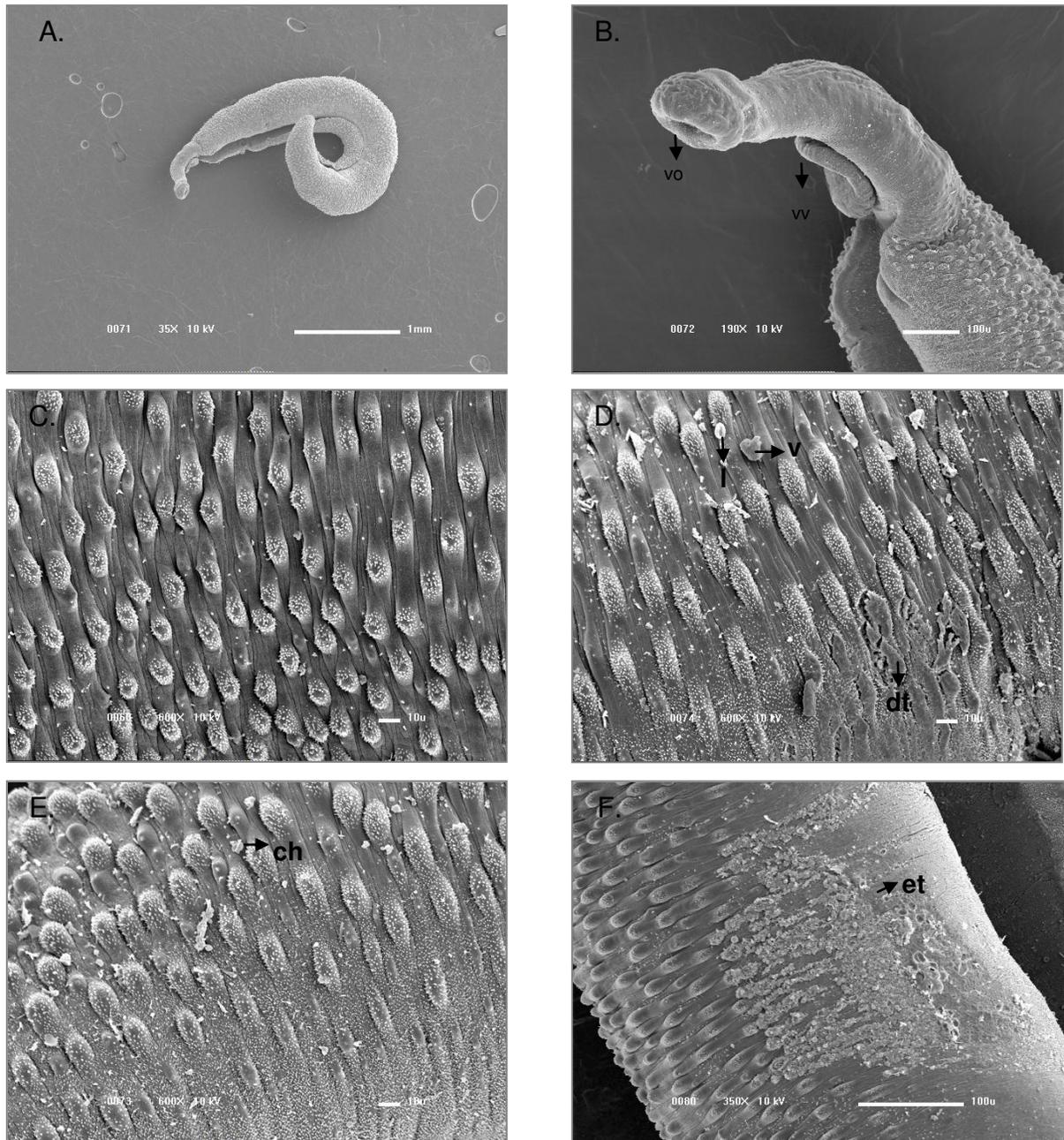
Prancha 2. Grupo controle negativo (não recebeu tratamento). (A) *S. mansoni*: vermes acasalados. (B) verme macho. (C) ventosas oral e ventral do verme macho. (D) ventosa oral do verme macho. (f) - verme fêmea; (cg) - canal ginecóforo; (m) - verme macho; (vv) - ventosa ventral; (vo) - ventosa oral; (ps) - papilas sensoriais.



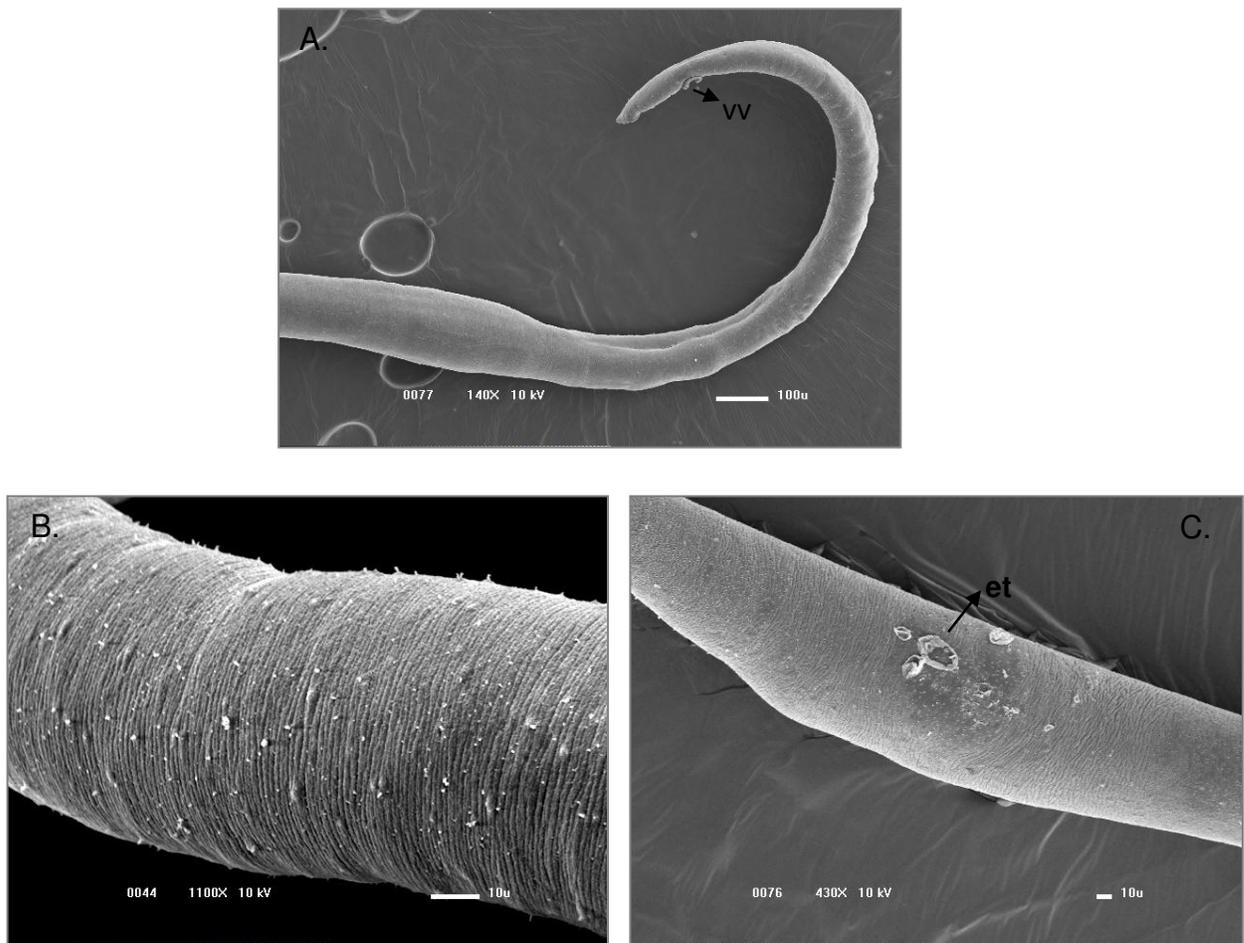
Prancha 3. Grupo controle negativo (não recebeu tratamento). (A): *S. mansoni*: verme fêmea. (B): ventosa oral (vo) e ventral (vv) da fêmea. (C): tegumento do verme macho. (D): tegumento do verme fêmea. (t) - tubérculos; (es) - espinhos.



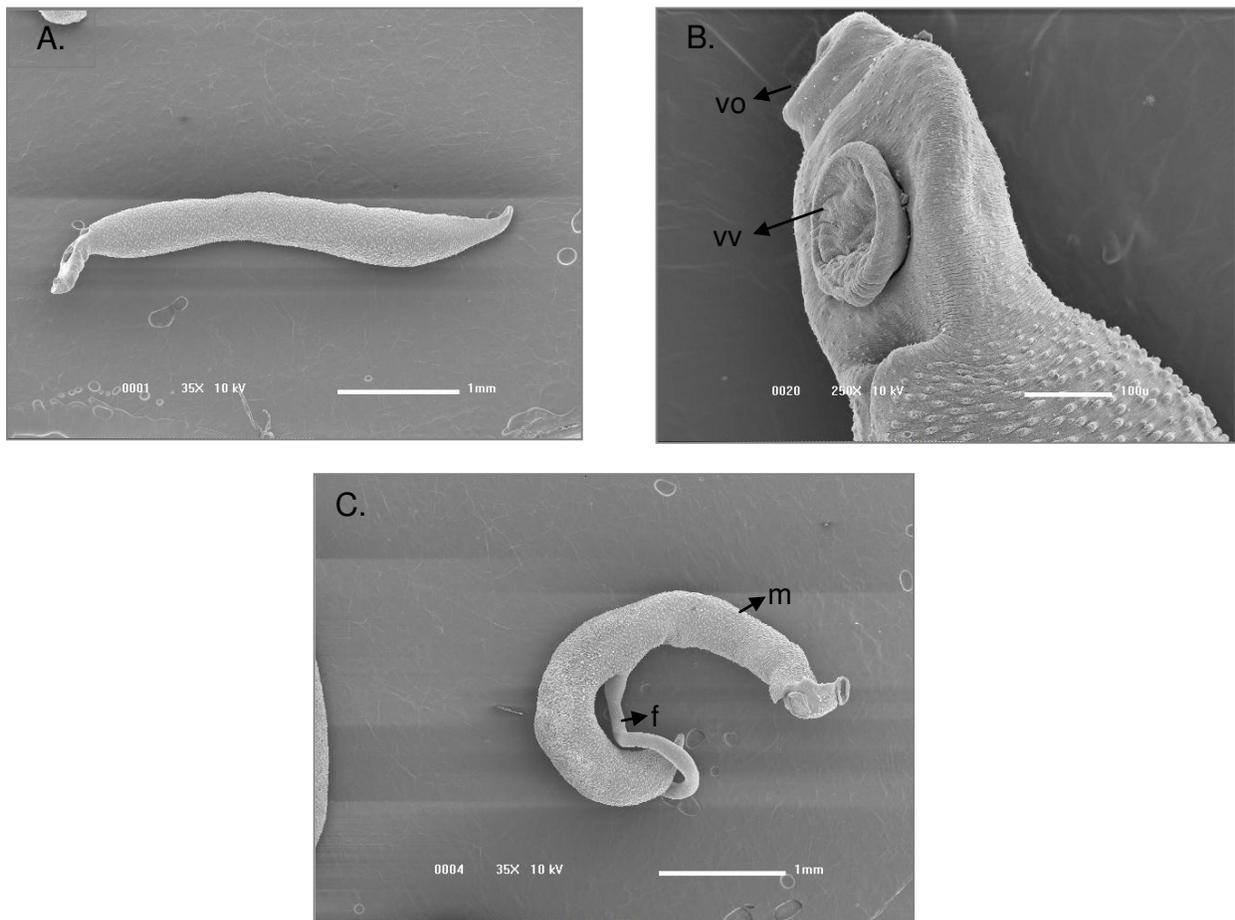
Prancha 4. Ação da FOEE de *C. verbenacea* sobre o tegumento dos machos adultos de *S. mansoni*. (A): vermes acasalados. (B): ventosa oral e ventral do macho. (C): tegumento do verme macho do grupo controle. (D) (E) (F): tegumento do verme macho submetido a tratamento com FOEE. (m) - verme macho; (f) - verme fêmea; (vo) - ventosa oral; (vv) - ventosa ventral; (dt) - destruição do tubérculo; (pes) - tubérculo apresentando perda de espinhos; (ch) - células do hospedeiro aderidas ao tegumento; (l) - leucócito do hospedeiro aderido ao tegumento; (v) - formação de vesículas no tegumento; (a) - formação de uma abertura no tegumento.



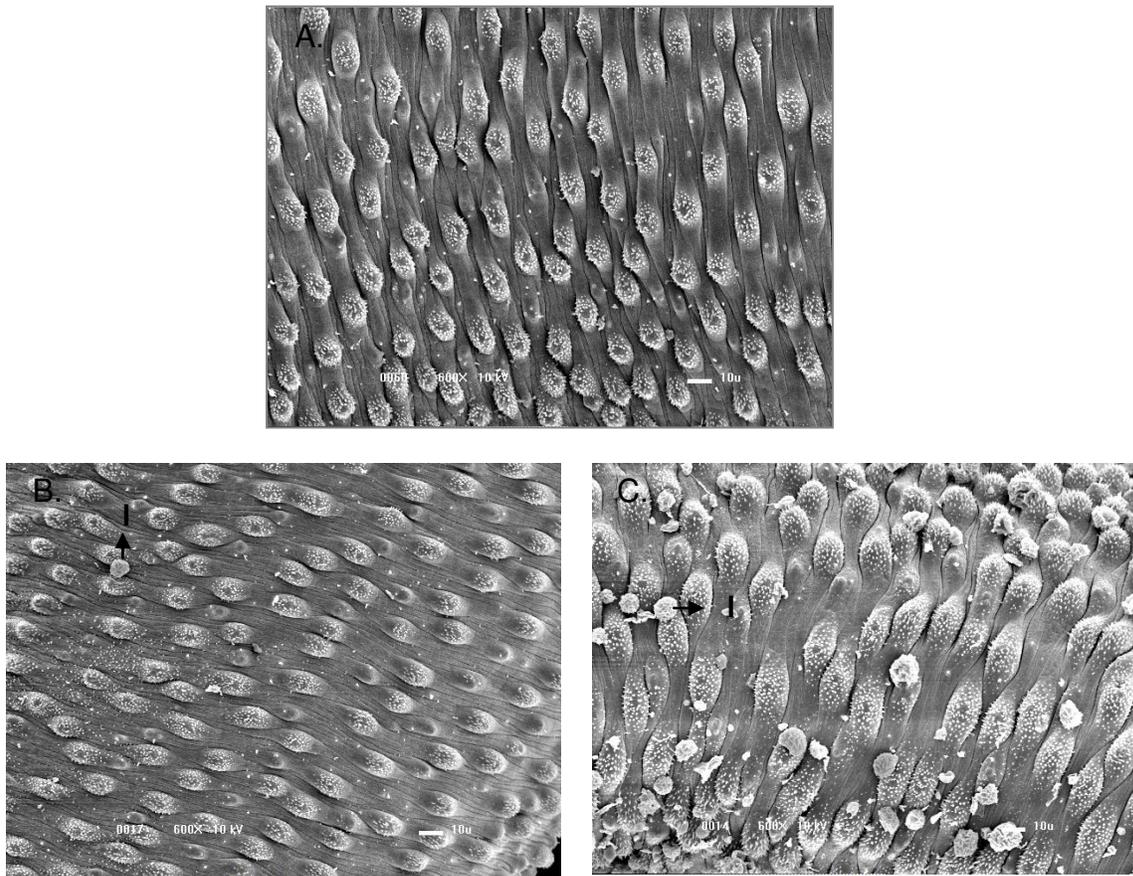
Prancha 5. Ação da F3 de *C. verbenacea* sobre o tegumento dos machos adultos de *S. mansoni*. (A): verme macho. (B): ventosa oral e ventral do macho. (C): tegumento do verme macho do grupo controle. (D) (E) (F): tegumento do verme macho. (vo) - ventosa oral; (vv) - ventosa ventral; (dt) - destruição do tubérculo; (v) - formação de vesícula; (l) - adesão de leucócitos do hospedeiro ao tegumento; (ch) - adesão de células do hospedeiro; (v) - formação de vesícula; (et) - erosão do tegumento.



Prancha 6. Ação da F3 de *C. verbenacea* sobre o tegumento de fêmea adulta de *S. mansoni*. (A): verme fêmea. (B): tegumento da fêmea do grupo controle. (C): tegumento da fêmea submetida a tratamento com F3. (vv) - ventosa ventral; (et) - erosão do tegumento.



Prancha 7. Ação do PZQ sobre o tegumento de adultos de *S. mansoni*. (A): verme macho. (B): ventosa oral e ventral do verme macho. (C): vermes acasalados. (m) - verme macho; (f) - verme fêmea; (vo) - ventosa oral; (vv) - ventosa ventral.



Prancha 8. Ação do PZQ sobre o tegumento de machos adultos de *S. mansoni*. (A): tegumento do verme macho do grupo controle. (B) e (C): tegumento do verme macho. (l) - leucócitos do hospedeiro aderidos ao tegumento.

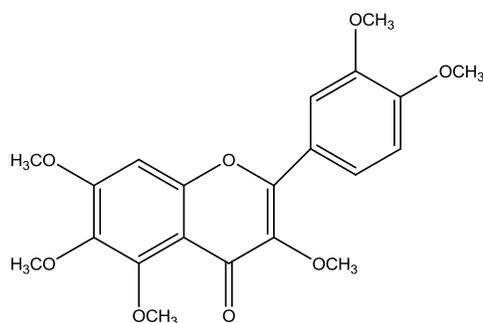
DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Estudos fitoquímicos

Através da análise por CCD da FOEE e das F3 e F3.6, observou-se a presença de um composto de coloração amarelo-marrom na parte superior da placa, que absorveu no UV (254 nm), com característica de ser um flavonóide.

Em trabalhos anteriores realizados pelo CPQBA, com as folhas secas de *C. verbenacea*, foi isolada a artemetina, um composto da classe dos flavonoides metoxilados. Na figura 33 está apresentada a estrutura da artemetina.



Artemetina

Figura 33. Estrutura química da artemetina.

Os flavonoides são substâncias amplamente distribuídas na natureza que contribuem para a coloração de flores, frutos e folhas das plantas. Alguns efeitos farmacológicos já foram relatados para os flavonoides como ação anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (ALONSO, 1998).

Existe uma controvérsia em relação à atividade anti-inflamatória da artemetina. Sertié *et al.* (1988) constataram que o extrato bruto hidroalcoólico de *C. verbenacea* reduziu o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos, sugerindo ser o princípio ativo responsável pela atividade anti-inflamatória desta erva. Estudos posteriores com flavonoides isolados desta planta demonstraram, no entanto, que a artemetina não é a principal substância responsável por esta ação, pois a atividade específica deste composto foi 54

vezes menor que a observada no extrato bruto (SERTIÉ *et al.*, 1990). Da mesma forma, Oliveira (2002) observou que a fração rica em artemetina não reduziu o edema de pata induzida por carragenina em camundongos, excluindo, portanto, a participação deste composto na atividade anti-inflamatória de *C. verbenacea*.

Neste trabalho observou-se que a artemetina induziu a parada na oviposição pelas fêmeas de *S. mansoni* nos testes *in vitro*, sugerindo ser um dos compostos responsável por essa atividade. A ação da artemetina anti-*S. mansoni*, bem como na oviposição deste verme, ainda não foi relatada pela literatura.

6.2 Ensaio *in vitro*

Na busca por novos fármacos para a terapêutica experimental da esquistossomose mansônica, o uso de triagens *in vitro* é importante, pois visa encontrar uma substância líder ou guia que possa ser posteriormente usada em ensaios pré-clínicos, reduzindo os custos desse processo. Por essa razão, quando são testadas empiricamente substâncias em que não há um prévio conhecimento sobre a ação em determinados alvos, o teste *in vitro* fornece um parâmetro inicial para que se possa, posteriormente, partir para uma abordagem seletiva, permitindo uma investigação biológica de compostos quimicamente derivados daquele, guia, que anteriormente demonstrou ter alguma atividade sobre o organismo em estudo. Através dessa triagem inicial, vários parâmetros podem ser observados, visando à avaliação da viabilidade do organismo-alvo (KATZ, 2008).

6.2.1 Sobrevida de adultos de *S. mansoni* em presença de OE, FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*

Nesse estudo, foi observada a sobrevida de adultos de *S. mansoni*, após a adição das amostras de *C. verbenacea*, durante 72 horas de observação. Até a presente data, não foram relatados ensaios com essa espécie de planta contra a esquistossomose mansônica. Dessa forma, os resultados *in vitro* indicaram que *C. verbenacea* apresenta atividade esquistossomicida, uma vez que foi capaz de matar até 100% dos vermes nas concentrações mais altas (400 e 200 µg/mL) e até 80% nas mais baixas (100 e 50 µg/mL). Sendo assim, as amostras de maior atividade para esse parâmetro foram as FOEE e F3.

Testes *in vitro* realizados com extratos brutos de plantas brasileiras tais como *Piper crassinervium* e *P. gaudichaudianum* (pimentas) e de seus compostos, como a amida piplartina, na sobrevivência de adultos de *S. mansoni*, linhagem BH, indicaram mortalidade de 100% desses para a concentração de 100 µg/mL, após 120 horas de observação. Ensaio feito com a concentração de 50 µg/mL de extrato bruto de *Potomorphe umbellata* (açariçoba) e das pimentas *Piper fuliginum*, *P. diospyrifolium*, *P. crassinervium* e *P. gaudichaudianum*

apresentaram mortalidade de 100%, nas mesmas condições, com exceção dessa última espécie, em que houve 75% (MORAES, 2011b).

Ensaio *in vitro* feitos com o PZQ, com o objetivo de analisar a sobrevivência dos vermes incubados por 8 dias frente à diferentes concentrações do fármaco, demonstraram índices de mortalidade de 25% com 40 e 80 µg/mL para a linhagem de Porto Rico (PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004). No presente trabalho, observou-se taxas de 90%, para a linhagem BH, com a concentração de 50 e 100 µg/mL, após 3 dias de observação.

Comparando-se essas taxas obtidas com as espécies de plantas descritas anteriormente (e que vem atualmente sendo estudadas no Brasil contra esquistossomose mansônica) e o PZQ, pode-se observar que a mortalidade para as FOEE e F3 de *C. verbenacea*, foi alta nas concentrações próximas ou idênticas às testadas pelos autores (50 e 100 µg/mL).

Em relação à susceptibilidade entre machos e fêmeas, neste trabalho, para todas as amostras analisadas, houve ação preferencial destas pelos vermes machos. Os ensaios feitos com o PZQ também demonstraram ação preferencial por machos. Outros estudos *in vitro* com esse fármaco apresentaram essa atividade, quando testados em casais de *S. mansoni* atestando que, principalmente quando estão acasalados, os machos tendem a ser mais susceptíveis que as fêmeas. Pica-Mattoccia & Cioli (2004) observaram que a ação do PZQ, tanto *in vitro* como *in vivo*, é dependente de alguns fatores tais como a idade do verme (sendo menos eficiente para as formas imaturas), do sexo deste e se está ou não acasalado (isso porque fêmeas provenientes de infecções unissexuais demonstraram *in vitro* e *in vivo* pouca susceptibilidade ao PZQ).

Segundo esses mesmos autores, a baixa sensibilidade das fêmeas ao referido fármaco pode ser considerada algo intrínseco desse sexo, pois esse fato pode ser observado tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, ou seja, fora e dentro do hospedeiro.

Imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura demonstraram maiores danos no tegumento de machos (linhagem Porto Rico) do que de fêmeas, quando submetidos a 100 µg/mL de PZQ, *in vitro*, havendo extensas vacuolização e degeneração indicando que o tegumento desses são mais sensíveis à ação do medicamento (SHAW & ERASMUS, 1983; HARNETT & KUSEL, 1986). Cercárias machos de *S. mansoni* também mostraram ser mais susceptíveis ao PZQ em testes *in vitro*. Apesar desse fenômeno não ter sido ainda completamente esclarecido, acredita-se que essa susceptibilidade dependente do sexo do parasito pode ser explicada por diferenças existentes no canal de cálcio de machos e fêmeas, uma vez que a alteração no influxo desse íon no parasito quando submetido ao PZQ, consiste num dos principais mecanismo de ação do fármaco (LIANG *et al.*, 2010).

Finalmente, estudos *in vitro* realizados com compostos de plantas medicinais, como a piplartina (extraída de *P. tuberculatum*), não demonstraram ação preferencial por um dos sexos do parasito da linhagem BH (MORAES *et al.*, 2010). Por outro lado, já foi relatado que o artesunato (derivado da artemisinina e extraído de *Artemisia annua*) apresenta ação preferencial por fêmeas, *in vitro*, nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg/L, para a linhagem Porto Rico (MITSUI *et al.*, 2009). Estudos feitos com extratos do rizoma de gengibre (*Zinziber officinale*) indicaram ação preferencial por vermes machos, especialmente com a concentração de 100 mg/L (SANDERSON *et al.*, 2002). Dessa forma, variação na susceptibilidade de machos e fêmeas tem sido observadas em diversos compostos esquistossomicidas, no entanto, esse fenômeno ainda não foi completamente elucidado (POPIEL & ERASMUS, 1982; FALLON *et al.*, 1994; SANDERSON *et al.*, 2002).

6.2.2 Efeito de FAEE, OE, FOEE, refração e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, na atividade motora e acasalamento de adultos de *S. mansoni*

A redução da atividade motora dos adultos de *S. mansoni*, após a adição das amostras testadas e durante 72 horas de observação, foi classificada qualitativamente como leve ou significativa. Apesar de subjetivo esse critério é empregado por vários autores para analisar os testes *in vitro* (XIAO *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2010; PARREIRA *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2010).

Em *S. mansoni* o controle da atividade motora ocorre por diversos neurotransmissores ou neuromoduladores, tais como: os pertencentes ao grupo de mediadores do tipo amina (serotonina, dopamina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina); aos do tipo aminoácidos (glutamato, γ -ácido aminobutírico - GABA) e aos neuropeptídeos (peptídeos da família FMRF-amidas - FaRPs) (FRIPP, 1967; BENNETT & BUEDING, 1971; GIANUTSUS & BENNETT, 1977; GUSTAFSSON, 1987; MAIR *et al.*, 2000; MENDONÇA-SILVA *et al.*, 2004).

Cada um desses neurotransmissores/neuromoduladores atuam de formas diferentes na motilidade aumentado-a (serotonina), diminuindo-a (acetilcolina) ou mantendo-a constante (dopamina, noradrenalina, adrenalina, glutamato, GABA e FaRPs). Assim, a partir da movimentação que o verme adquire após a adição de uma amostra a ser testada, ocorrem evidências farmacológicas da presença desses neurotransmissores no meio de incubação (NOËL, 2008). Alguns autores sugerem que certos fármacos esquistossomicidas (oxaminiquina, metrifonato, hancantona, lucantona e imidazolidinas) atuam nos receptores de acetilcolina dos vermes. Outros sugerem que certos derivados benzodiazepínicos atuam nos receptores de GABA (ADEWUNMI & OJEWOLE, 1985; CAMACHO *et al.*, 1994; MENDONÇA-SILVA *et al.*, 2004).

No presente estudo, todas as amostras testadas provocaram alterações no padrão da atividade motora dos vermes, fazendo com essa diminuísse. Considerando os relatos na literatura, é possível que as alterações na atividade

motora de adultos de *S. mansoni* na presença das amostras de *C. verbenacea*, estejam associadas a neurotransmissores/neuromoduladores.

Estudos realizados no Brasil com piperaceas (pimentas) e samambaias (*Dryopteris* sp.) sobre *S. mansoni*, *in vitro*, linhagens BH e LE respectivamente, demonstraram diminuições na motilidade do verme, em paralelo à concentração do composto (MORAES *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Neste trabalho as alterações na motilidade também foram proporcionais à concentração testada.

Ensaio feito com PZQ demonstraram alterações significativas de movimentação com a concentração de 10 μ M (MAGALHÃES *et al.*, 2009, 2010; MORAES *et al.*, 2010) sendo que o mesmo foi encontrado no presente trabalho em todas as concentrações testadas.

O estudo *in vitro* da ação de amostras com atividade anti-*S. mansoni* sobre a motilidade e, por consequência, musculatura do verme é importante, pois esta pode servir como alvo terapêutico. De acordo com Noël (2008) o sistema muscular dos helmintos representa uma fonte fértil em alvos para fármacos anti-helmínticos, uma vez que já foi relatado o sucesso de certos medicamentos que tenham tal sistema como alvo sobre várias espécies de helmintos, caso da ivermectina, por exemplo. Esse fármaco atua nos receptores de acetilcolina dos vermes (nematódeos gastrintestinais de ruminantes), provocando sua paralisia e desprendimento da mucosa gástrica sendo, por fim, levado passivamente ao meio externo com as fezes (SANGSTER *et al.*, 2005).

Neste estudo, além da avaliação das amostras de *C. verbenacea* sobre a atividade motora de adultos de *S. mansoni*, também foi analisada a atividade dessas sobre o acasalamento dos vermes. Foi constatado que todas as amostras testadas apresentaram atividade sobre os casais, separando-os proporcionalmente à concentração destas no meio de cultura. A separação, nestes casos, ocorreu antes mesmo de se observar a ação esquistossomicida.

O mesmo processo foi relatado em trabalhos feitos por Moraes *et al.* (2011) com os compostos pipartina, piperina, além dos extratos de *P.*

tuberculatum, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuligineum* e *P. gaudichaudianum* e por Magalhães *et al.* (2009, 2010) com a aspidina, ácido flavaspídico, metileno-bis-aspidinol, obtidos de *Dryopteris* sp., e curcumina, obtida de *Curcuma longa* (açafraão). Nesses, os extratos e compostos tiveram ação sobre a separação dos casais dependente da concentração, aumentado o número de vermes separados com o aumento dessa, com exceção da aspidina, em que a menor concentração proporcionou a separação de maior quantidade de vermes.

Sabe-se que, particularmente nos vermes machos de *S. mansoni*, entre o tegumento e as células subtegumentares, encontra-se uma região de musculatura lisa, tipicamente organizada em camadas circulares e longitudinais, com algumas fibras adicionais radialmente dispostas. Essa musculatura longitudinal seria importante para a motilidade do verme enquanto que a musculatura circular teria como função primordial à manutenção do diâmetro do canal ginecóforo e, portanto, do pareamento do casal de verme (NOËL, 2008). As amostras testadas podem, dessa maneira, ter afetado a musculatura dos vermes, provocando a sua separação.

Em relação aos testes realizados com PZQ, a medida em que aumentou-se a concentração, houve diminuição da quantidade de vermes separados. Além disso, esse fármaco apresentou menor porcentagem de vermes separados (entre 20 e 60%) em relação às amostras testadas (entre 60 e 100%) e essa só ocorreu antes da ação esquistossomicida nas concentrações mais baixas (50 e 100 µg/mL). Resultado parecido foi encontrado por Magalhães *et al.* (2009, 2010) que demonstraram que com a concentração de 10 µM, não ocorre alteração no acasalamento dos vermes.

Uma possível explicação para esse fenômeno seria a redução da motilidade, seguida de contração e paralisia que os casais de vermes apresentam após serem submetidos ao PZQ, principalmente nas concentrações mais altas. Assim, por causa dessa imobilidade os vermes não conseguiram separar-se.

A separação dos casais de *S. mansoni* é importante, pois análises feitas por microscopia eletrônica revelaram degeneração do vitelário de fêmeas adultas

quando separadas do macho, o que pode ocasionar em alteração na produção de células vitelínicas e, por consequência, em diminuição da produção de ovos (POPIEL *et al.*, 1984).

6.2.3 Efeito de FAEE, OE FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, sobre alterações tegumentares, musculares e em órgãos internos sobre adultos de *S. mansoni*.

A superfície do *S. mansoni* constitui em um complexo sincicial que representa a principal rota de absorção de nutrientes (glicose, aminoácidos e outros), excreção de metabólitos (ácido láctico e outros) e proteção ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Dessa forma, o tegumento representa um alvo crucial de ação dos fármacos com já conhecida ação esquistossomicida e aos seus novos candidatos (HOCKLEY & McLAREN, 1973; SHUHUA *et al.*, 2000).

No presente trabalho a destruição do tegumento foi mais presente nos vermes machos do que nas fêmeas. De acordo com os resultados anteriormente discutidos acerca da sobrevivência dos vermes (tópico 5.1.1) em que houve maior mortalidade de machos e, observando que a destruição do tegumento foi maior nesses, pode-se inferir que as amostras de *C. verbenacea* possuem um ou mais compostos que apresentam atividade contra adultos de *S. mansoni*, principalmente para os vermes machos.

As quatro concentrações (50, 100, 200 e 400 µg/mL) testadas para todas as amostras provocaram destruição tegumentar nos vermes (em especial para as FOEE, F3.6 e F3.7-3.9), o que pode indicar que as amostras derivadas de *C. verbenacea* tenham como alvo-terapêutico o tegumento desses. Magalhães *et al.* (2009) obteve com a curcumina danos tegumentares apenas na concentração mais alta: 100 µM. Mitsui *et al.* (2009) também relatou danos (formação de vesículas) no tegumento dos vermes machos com concentrações de 20 e 40 mg/L de artesunato enquanto que as de 5 e 10 mg/L não provocaram lesões. Moraes *et al.* (2010) obteve danos no tegumento dos vermes com concentrações mais baixas (a partir de 9,5 µM) de pipartina e mais altas (até 472,7 µM), sendo que danos mais extensos foram observados a partir da concentração de 315,1 µM.

Em relação ao teste realizado com PZQ, houve destruição tegumentar na maioria dos vermes analisados, mais frequentes nos machos, estando de acordo com vários autores que testaram a ação deste fármaco *in vitro* e que

comprovam a ação dependente do sexo do parasito (FETTERER *et al.*, 1980; ANDREWS, 1981; ARAGON *et al.*, 2009; PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004).

A análise empregada para avaliar *in vitro* o efeito das amostras testadas sobre *S. mansoni* trata-se de um critério qualitativo e subjetivo, porém empregado por diversos autores (XIAO *et al.*, 2007; BRAGUINE *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2009, 2010; NEVES *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011). A microscopia de luz, no entanto, não permite detalhar os danos apresentados pelos vermes. Por essa razão foi feito o estudo do tegumento do verme submetido a amostras de *C. verbenacea* pela Microscopia Eletrônica de Varredura, como pode ser visto no tópico 5.2.1.

Em relação às alterações musculares foi observado que de todas as amostras testadas, apenas a FAEE e o OE não apresentaram vermes contraídos, porém apresentaram redução na atividade motora. Conforme visto anteriormente (tópico 5.1.2) essas amostras provocaram diminuição na atividade motora dos vermes, sendo estas significativas para até 60% dos vermes com a FAEE e em até 30% para o OE. Dessa forma, pode-se inferir que, especialmente a FAEE, induziu uma paralisia flácida em parte dos vermes, ou seja, ocorreu perda significativa da movimentação ou até mesmo a imobilização, porém não houve contração e sim perda do tônus muscular (BARKER *et al.*, 1966; HILLMAN & SENFT, 1973; TOMOSKY *et al.*, 1974; MELLIN *et al.*, 1993; PAX & BENNETT, 1991;). Paralisias flácidas podem ser provocadas por acetilcolina, podendo então o FAEE e OE conter compostos que atuem em receptores para esse neurotransmissor existentes no verme.

Corroborando a hipótese de que as amostras testadas possuem ação *in vitro* preferencial por vermes machos, a maioria dos vermes que sofreram contrações foram os indivíduos pertencentes a esse sexo.

Em relação ao ensaio feito com PZQ, as concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL tiveram maior número de machos contraídos e apenas na de 400 µg/mL, todos os vermes apresentaram-se contraídos. Pica-Mattoccia & Cioli

(2004), descreveram contrações de *S. mansoni*, proporcionais à concentração de PZQ a que foram submetidos (entre 0,1 e 1 µg/mL).

De acordo com dados obtidos da literatura, esse fármaco promove um rápido influxo de cálcio, seguido de contração, paralisia e destruição do tegumento. Acredita-se que o influxo desse íon se deve pela ativação dos receptores de adenosina - conhecidos moduladores dos canais de cálcio - existentes no parasito, pelo fármaco (PAX *et al.*, 1978; BECKER *et al.*, 1980; FETTERER *et al.*, 1980; CAFFREY, 2007; DOENHOFF *et al.*, 2008). Outros compostos podem também provocar contrações em *S. mansoni*, caso dos derivados de benzodiazepinas, como o Ro 11-3128, que também promove influxo de cálcio, contrações musculares, paralisias e destruição tegumentar. Entretanto, de acordo com estudos feitos com compostos inibidores dos canais de cálcio que bloqueiam a ação do PZQ, existe a hipótese de que ambos atuem em receptores de cálcio diferentes (PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2007; PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2008; DOENHOFF *et al.*, 2008). Assim como no caso de fármacos com comprovada atividade esquistossomicida, é difícil explicar o mecanismo de ação das amostras de *C. verbenacea* que levem à contração do parasito.

Algumas amostras (FAEE, F3.5, F3.6 e F3.7-3.9) provocaram alterações nos órgãos internos nas fêmeas, ocorrendo a formação de protuberâncias localizadas após o ovário. Essa mesma alteração já foi relatada em ensaios *in vitro* com o imatinib, medicamento empregado no tratamento de certos tipos de câncer. Beckmann & Grevelding (2010) relataram que esse fármaco induziu o aparecimento desse tipo de alteração morfológica nas fêmeas com as concentrações de 10, 50 e 100 µM. De acordo com esses autores, o uso da microscopia confocal à laser permitiu verificar alterações no formato dos ovários e dos oócitos.

O PZQ induz alterações nos ovários e na diferenciação das células vitelínicas. Na espécie *S. japonicum* pode ser encontrado em grande quantidade nas glândulas vitelínicas, sugerindo que esse tecido seja mais susceptível a ação desse fármaco (XIAO *et al.*, 1981; SHAW & ERASMUS, 1988). Estudos *in vitro*

realizados com um composto inibidor de proteína-quinase, a Herbimicina A, indicaram que esse atua na atividade mitótica das glândula vitelínicas, sugerindo que certos candidatos à fármacos tenham como alvo o sistema reprodutor das fêmeas (KNOBLOCH *et al.*, 2007).

Conforme os resultados obtidos no presente estudo, acredita-se que o FAEE e as F3.5, F3.6 e F3.7-3.9 de *C. verbenacea* apresentem compostos que poderiam ter ação no aparelho reprodutor das fêmeas.

6.2.4 Efeito da FAEE, FOEE, refrações e artemetina, extraídos de *C. verbenacea*, sobre a oviposição das fêmeas adultas de *S. mansoni*

Das amostras derivada de *C. verbenacea* primeiramente testadas, a FOEE destacou-se em relação a oviposição pois esta foi ausente nas concentrações de 200 e 400 µg/mL. Dos refrações da FOEE, destacaram-se as F3 e F4-5 e, do refração da F3, as F3.6 e F3.7-3.9, não apresentando oviposição em nenhuma concentração testada. Dessas amostras, as fêmeas de *S. mansoni* submetidas às F3.6 e F3.7-3.9 apresentaram alterações nos órgãos internos, definidas como protuberâncias localizadas após o ovário, corroborando a hipótese de que algumas frações de *C. verbenacea* podem conter compostos que alterem o sistema reprodutor feminino dos vermes e, assim, sua oviposição.

Ensaio *in vitro* realizados por Magalhães *et al.* (2009) com a curcumina detectaram oviposição, mesmo com a concentração mais alta (10 µM). Moraes *et al.* (2010) mostraram que a pipartina a reduz na medida em que se aumenta a concentração do composto no meio de cultura. Mitsui *et al.* (2009) relataram decréscimo na postura de ovos pelas fêmeas em 7 dias de observação de teste *in vitro* com artesunato. Nesse caso, foi observado que as concentrações de 20 e 40 mg/L apresentaram picos de oviposição no segundo e terceiro dia, respectivamente. A partir do quarto dia as fêmeas não ovipuseram, enquanto que as do grupo controle (que não entraram em contato com amostras ou fármacos) apresentaram maior eliminação de ovos no segundo dia, diminuição a partir do terceiro e parada no sétimo.

No presente trabalho o pico de oviposição ocorreu no terceiro dia para o grupo controle, DMSO e para a maioria das concentrações e amostras testadas (a exceção foi o OE, com pico no segundo dia de observação, para 50 e 100 µg/mL). Ensaio *in vitro* evidenciaram que a oviposição é caracterizada por três etapas: uma fase inicial em que as fêmeas produzem poucos ovos, um período de máxima

oviposição e, finalmente, uma redução progressiva no número de ovos eliminados (BARTH *et al.*, 1996; EL-RIDI *et al.*, 1997)

Quando testou-se a ação do composto isolado da FOEE de *C. verbenacea*, a artemetina, a oviposição cessou, indicando ser, possivelmente, o responsável por esse resultado

Em virtude dos resultados obtidos com a artemetina sobre a mortalidade dos vermes (obteve-se taxas de 40% com as concentrações de 50 e 100 µg/mL; 60% com a de 200 µg/mL e 90% com a de 400 µg/mL) em que foi constatada baixa atividade esquistossomicida em relação às outras frações testadas é possível inferir que, apesar desse composto induzir paradas na oviposição, ele pode não ser o principal responsável por matar o verme. Outra possibilidade é que, quando isolado, seu potencial esquistossomicida diminua, necessitando da sinergia de outros componentes (presentes na FOEE e refrações - em especial a F3) para provocar maiores taxas de mortalidade.

As amostras que não promoveram a oviposição das fêmeas em todas as concentrações apresentaram 100% de casais de vermes separados até o fim do experimento, sugerindo também que a parada na postura dos ovos pode ser decorrente dessa separação.

Os resultados obtidos com o PZQ demonstraram ausência de oviposição em todas as concentrações testadas. Ensaio *in vitro* realizado com PZQ por Moraes (2011b) indicou redução desta (em relação ao grupo controle negativo – sem adição de extratos ou fármacos) na ordem de 0,44%, para concentração de 1 µg/mL.

A ausência de oviposição nos testes *in vitro* é importante, uma vez que, utilizando esse tipo de triagem para descobrir substâncias candidatas a fármacos esquistossomicidas e, sabendo que a patologia da esquistossomose mansônica está associada a presença dos ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro, a descoberta desses compostos podem auxiliar na eliminação do principal agente

patogênico além de interromper sua transmissão (GRYSEELS *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2007; KATZ, 2008).

6.2.5 DLs 50 e 90

O cálculo das DLs 50 indicou que as frações orgânica, 3 e 4-5 apresentaram doses letais para 50% dos vermes, em 72 horas, < 50 µg/mL, assim como o PZQ. Em compensação as DLs 90 requeridas para essas amostras, nesse mesmo período, foram superiores a este medicamento (70; 144,1; 116,6 e 150,0 µg/mL para PZQ, frações orgânica, 3 e 4-5, respectivamente).

Pesquisa realizada *in vitro* com o OE de *Ageratum conyzoides*, erva conhecida popularmente no Brasil como mentrasto, apresentou DLs 50 de 198,8 e 75,7 µg/mL nos períodos de 24 e 120 horas, respectivamente, para adultos de *S. mansoni* da linhagem LE (MELO *et al.*, 2011).

Hagan *et al.* (2004) determinaram que a DL 50 para o PZQ em estudos *in vivo* é de 75 mg/kg para linhagens do verme sensíveis ao fármaco e de 200 mg/kg para as não sensíveis. Pica-Mattoccia & Cioli (2004), por sua vez, definiram que a DL 50 para a linhagem Porto Rico, *in vivo*, classificada como sensível ao PZQ, é de 80,9 mg/kg, em tratamentos realizados com 5 concentrações do fármaco (12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg) em 5 dias consecutivos, administrados após 49 dias de infecção, e de 2456,0 mg/kg, com o mesmo esquema de tratamento, efetuado, porém, após 28 dias de infecção.

O estudo das DLs é importante, pois sua função é medir a capacidade de um agente de produzir mais ou menos efeito sobre determinados organismos, quando em condições padronizadas de uso. As DLs consistem, portanto, numa manifestação tóxica que pode ser medida (HODGE & STERNER, 1949). Dessa forma, para o *S. mansoni*, quando menor as DLs 50 e 90, melhor a ação esquistossomicida do candidato a fármaco, pois em menores concentrações são capazes de produzir maior mortalidade.

6.3 Ensaios *in vivo*

Quando se testa um composto visando avaliar sua ação esquistossomicida deve-se pensar que nem sempre há correspondência entre os testes *in vitro* e os *in vivo*. Katz (2008) cita diversos exemplos de fármacos anti-*S. mansoni* que não apresentam correlação entre os resultados obtidos com esses dois tipos de ensaios. Relata, por exemplo, que os diaminodifenoxialcanos apresentaram alta atividade em camundongos infectados experimentalmente, porém teve baixa ação *in vitro*. O oposto ocorreu com a glucosamida em que se observou alta atividade *in vitro* e baixa *in vivo*. Diz ainda que a hicantona e o UK 3883 (que originou a oxaminiquina) não apresentaram atividade *in vitro*, porém, quando administradas em camundongos e à humanos deram origem a metabólitos hidroximetilados que passaram a ter ação contra os vermes *in vitro* (RAISON & STANDEN, 1955; BUEDING & PENEDO, 1957; BRENER, 1960; PELLEGRINO *et al.*, 1962; CIOLI *et al.*, 1995).

Dessa forma, ainda de acordo com esse autor, duas fases sucessivas devem ser consideradas na avaliação da atividade terapêutica de novos agentes esquistossomicidas: triagens e ensaios pré-clínicos. Os ensaios pré-clínicos visam obter o maior número de informações possíveis antes de se estabelecer os ensaios clínicos.

O presente estudo testou, portanto, a ação de *C. verbanaea* de duas formas, *in vitro* e *in vivo*, tanto para realizar uma triagem inicial com os diferentes frações e OE da planta como para, posteriormente, verificar a ação dessas no *S. mansoni* dentro do organismo do hospedeiro definitivo.

Nesse trabalho, as triagens *in vitro* indicaram que as amostras de maior atividade anti-*S. mansoni* foram as FOEE e F3, principalmente, por terem apresentado maior taxas de mortalidade além de baixas DLs 50 e 90. Por essa razão foram escolhidas para dar continuidade aos testes pré-clínicos, *in vivo*, realizados em Camundongos fêmeas, Balb/c.

Em testes pré-clínicos certos parâmetros devem ser analisados tais como a distribuição do parasito no sistema porta-hepático pós tratamento dos camundongos; redução do número de vermes recuperados nesse sistema; fuga dos helmintos para o fígado; proporção entre o número de *S. mansoni* machos e fêmeas; redução do número de ovos nas fezes; estudo do oograma - visando inferir se houve parada na postura dos ovos - e das reações granulomatosas (PELLEGRINO & KATZ, 1968). Nos próximos tópicos os resultados serão abordados seguindo esses parâmetros de avaliação.

6.3.1 Ação das FOEE e F3 sobre os vermes adultos de *S. mansoni*

De acordo com Schubert (1948) e Standen (1963), uma das ações de fármacos anti-*S. mansoni* consiste em alterar a distribuição dos vermes no organismo do hospedeiro. Em infecções maduras (quando a totalidade dos vermes atingiram a maturidade sexual e iniciaram a postura dos ovos) é de 60-70% nos vasos mesentéricos, 20-30% na veia porta e 0-20% nas veias intra-hepáticas.

Conforme Pellegrino & Katz (1968), compostos ativos contra o parasito podem produzir um deslocamento total ou parcial dos vermes para o fígado. Entretanto, o encontro de vermes no fígado não é, necessariamente, uma comprovação da atividade esquistossomicida de um fármaco, pois em alguns casos, a migração dos vermes das veias mesentéricas e porta para o fígado é reversível e, em outros, irreversível, quando ocorre morte do verme (MELHORN *et al.*, 1981).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que houve deslocamento dos vermes para o fígado nos grupos tratados com as frações de *C. verbenacea* e com o PZQ. No entanto, a proporção dos vermes encontrados nas veias mesentéricas, porta e no fígado estão de acordo com a estimada por Schubert (1948) e Standen (1963).

Foi possível observar que com a menor concentração (40 mg/kg), testada aos 45 dias de infecção, apenas a FOEE apresentou deslocamento do *S.*

mansoni para o fígado. O deslocamento para os grupos tratados com PZQ só ocorreu a partir da concentração de 100 mg/kg e, para a F3, a partir de 200 mg/kg. A maior porcentagem de vermes encontrados nesse órgão ocorreu com a maior concentração (300 mg/kg) de FOEE (10,7%) e de PZQ (10,6%). Esses resultados indicam que o PZQ e as frações foram capazes de produzir deslocamento.

Para os tratamentos realizados com PZQ, nesse mesmo dia, o deslocamento dos vermes foi dependente da concentração, estando também relacionada à mortalidade dos mesmos. Dessa forma, a concentração que apresentou maior quantidade de helmintos no fígado, também mostrou maior índice de redução de vermes (67,4%).

Sabe-se que o PZQ induz, dentre outros danos, à destruição da ventosa oral do parasito. Isso faz com que esse se desprenda da parede dos vasos sangüíneos, sendo levado até o fígado onde ocorrerá a sua morte (SHUHUA *et al.*, 2000). Assim, o encontro de vermes que sofreram a ação do PZQ no fígado, indica que o fármaco atuou no parasito provocando sua destruição, desprendimento dos vasos e, por conseqüência, deslocamento em direção a esse órgão.

O mesmo não ocorreu com a FOEE, ou seja, o encontro de *S. mansoni* no fígado não foi proporcional ao aumento da concentração, pois as maiores porcentagens de vermes deslocados foram obtidas com as de 40 mg/kg (7,3%) e 300 mg/kg (10,7%). Dessa forma, o aumento dessas não implicaria em acréscimo da quantidade de vermes no fígado, pois concentrações intermediárias (100 e 200 µg/mL) provocaram menor deslocamento do parasito ao órgão (5,8 e 5,3%, respectivamente) em relação à mais baixa (40 mg/kg).

Além disso, a maior porcentagem de deslocamento não esteve relacionada à maior taxa de redução de verme (40 mg/kg apresentou redução de vermes de 31,0% e fuga desses para o fígado de 7,3%; 300 mg/kg teve redução de 29,4% e fuga de 10,7%). Esses resultados indicam que o encontro de vermes nesse órgão pode ser decorrente do mecanismo de escape do parasito frente à FOEE não provocando a morte imediata do parasito.

Nos tratamentos realizados aos 60 dias de infecção, os grupos que receberam PZQ apresentaram vermes no fígado apenas com a maior concentração testada nesse período (200 mg/kg) mostrando, novamente, ser proporcional à concentração. Além disso, o deslocamento dos vermes mostrou estar relacionado com a mortalidade dos mesmos.

Em relação à F3, também se percebeu que a fuga dos parasitos para o fígado ocorreu a partir da concentração de 200 mg/kg, da mesma maneira como aconteceu nos tratamentos realizados no 45° dia de infecção.

A FOEE, não demonstrou fuga dos vermes para o fígado nos tratamentos feitos no 60° dia e a porcentagem de redução de vermes, da mesma forma, não foi proporcional ao aumento das concentrações. Por essa razão, é possível afirmar que a FOEE não é dose-dependente para esses parâmetros.

Pode-se inferir que o melhor tratamento para o PZQ foi o realizado aos 45 dias de infecção, com 300 mg/kg (principalmente por ter apresentado maior redução de vermes, alteração na proporção entre vermes machos e fêmeas e maior deslocamento do verme em direção ao fígado); para a FOEE foi o realizado no 45° dia com 40 mg/kg (em virtude do índice de redução de vermes, alteração na proporção entre machos e fêmeas em relação ao grupo controle e menor quantidade de vermes acasalados) e para a F3, nesse mesmo dia, com 100 mg/kg (por causa da taxa de redução no número de vermes e alteração na proporção de *S. mansoni* machos e fêmeas).

Outros compostos/fármacos já testados em *S. mansoni* também apresentam atividade esquistossomicida relacionada à idade do parasito. Experimentos realizados por Xiao & Catto (1989) e Xiao *et al.* (2000) mostraram que o artemeter possui maior ação para vermes no estágio de esquistossômulo. Assim, quando administrado entre 14 e 21 dias pós infecção, com a concentração de 300 mg/kg (em dois dias consecutivos), as taxas de redução de vermes é de 83 a 98%, enquanto que, com esse mesmo esquema de tratamento, há redução de vermes adultos na ordem de 30 à 51%. Por essa razão, vem sendo discutido a

utilização desse composto como fármaco profilático nas áreas endêmicas (UTZINGER *et al.*, 2000a, b).

O PZQ também apresenta ação esquistossomicida relacionada à idade do parasito. Muitos autores já concluíram que o PZQ é ineficaz para formas imaturas do verme (com cerca de 28 dias de idade). Outros, dizem que esse fármaco é ativo para formas do parasito com até 7 dias de idade ocorrendo, depois, um período de decréscimo na susceptibilidade, sendo que a idade de menor sensibilidade se dá aos 28 dias. Posteriormente, a susceptibilidade ao PZQ é retomada quando decorridos 40 dias após a infecção (GONNERT & ANDREWS, 1977; XIAO *et al.*, 1985, 1998; SABAH *et al.*, 1986; PICA-MATOCCHIA & CIOLI, 2004; CAFFREY, 2007).

Tanto o PZQ como as frações testadas alteraram a proporção entre vermes machos e fêmeas, em relação ao grupo controle. Em infecções experimentais a proporção entre machos e fêmeas variam dependendo do modelo animal utilizado e do tempo de infecção, podendo estar entre 1:1 a 2 ou 3:1 (LENZI *et al.*, 2008). Esse padrão foi obtido no presente trabalho para o grupo controle negativo. Dessa forma, foi observada ação preferencial por fêmeas com a FOEE e PZQ em ambos os dias de tratamento; a F3 apresentou ação preferencial por machos nas concentrações mais baixas (40 e 100 mg/kg) e, por fêmeas, nas mais altas (200 e 300 mg/kg) em tratamento realizado aos 45 dias. Aos 60 dias, a F3 atuou mais sobre as fêmeas. Não há relatos na literatura que diferenças nas concentrações de medicamentos ou candidatos a fármacos esquistossomicidas provoquem atuações diferentes em machos e fêmeas.

Esses resultados obtidos *in vivo*, em que se observou ação preferencial por fêmeas com todas as amostras/fármaco testados, distingue-se dos adquiridos com os testes *in vitro*, em que foi evidente a ação preferencial desses sobre os machos. Tais dados corroboram a hipótese de Katz (2008) atestando que nem sempre há correspondência entre os ensaios *in vitro* e os *in vivo*.

A ação preferencial por fêmeas é importante, pois pode promover a diminuição da eliminação de ovos e, por conseqüência, das lesões provocadas nos órgãos afetados e da transmissão da helmintíase (DELGADO *et al.*, 1992).

Em relação ao PZQ já foi relatado que doses subcurativas são capazes de matar *S. mansoni* de ambos os sexos (GONNERT & ANDREWS, 1977; MELHORN *et al.*, 1981). Delgado *et al.* (1992), no entanto, observaram em seus experimentos que a concentração de 250 mg/kg administrada 6 semanas após a infecção atua preferencialmente sobre as fêmeas. Pica-Matocchia & Cioli (2004) sugeriram que, assim como nos ensaios *in vitro* realizados por esses autores, no caso de infecções unissexuais as fêmeas se mostram menos sensíveis ao tratamento; porém, em infecções bissexuais, em tratamento realizado aos 49 dias de infecção, com concentrações crescentes (de 12,5 a 200 mg/kg) de PZQ administradas em 5 dias consecutivos, a ação preferencial é por machos.

A hipótese que poderia explicar a divergência entre esses autores seria a linhagem de *S. mansoni* utilizada. Delgado *et al.* (1992) testaram a ação do PZQ em linhagem BH (a mesma cepa foi empregada no presente estudo, obtendo-se a mesma ação preferencial por fêmeas) enquanto que Pica-Mtoccia & Cioli testaram a de Porto Rico. É sabido que linhagens diferentes de *S. mansoni* podem apresentar respostas divergentes ao mesmo tratamento sendo que essas diferenças comportamentais entre linhagens no hospedeiro vertebrado, são decorrentes da manifestação da expressão genotípica do verme (YOSHIOKA *et al.*, 2002).

6.3.2 Ação das FOEE e F3 sobre a oviposição de *S. mansoni*

Segundo Pellegrino & Katz (1968) a ação mais importante que um medicamento ou um candidato à fármaco esquistossomicida deve apresentar seria seu efeito sobre a eliminação dos ovos pelo *S. mansoni*. De acordo com Kikuth & Gönner (1948), essa avaliação é principalmente baseada na diminuição ou na completa interrupção da oviposição nos camundongos tratados. Martinez *et al.* (2003) sugerem que a contagem de ovos é um indicador da fecundidade dos vermes adultos mantidos *in vivo* e *in vitro*.

Nesse trabalho a oviposição foi avaliada de duas formas: 1. analisando os ovos eliminados ou que ainda serão levados ao ambiente pelas fezes; 2. analisando os ovos retidos nos tecidos do hospedeiro.

6.3.2.1 Ação das FOEE e F3 sobre OPG e Oograma

Os resultados obtidos com o exame das fezes dos camundongos infectados e tratados, indicaram que as FOEE e F3 atuaram na diminuição da oviposição de *S. mansoni*.

Maiores taxas de redução da oviposição foram obtidas com tratamento administrado aos 45 dias de infecção, com a concentração de 200 mg/kg, para ambas as amostras (FOEE - 63% - e F3 - 70%). Os tratamentos realizados aos 60 dias de infecção apresentaram maior redução de ovos também com a concentração de 200 mg/kg (FOEE - 85,1% - e F3 - 40,9%).

As reduções de ovos obtidas com tratamentos administrados aos 45 dias de infecção foram importantes pois nessa fase ocorreu o ápice da oviposição pelas fêmeas (média de ovos/grama de fezes aos 45 dias no grupo controle negativo = 100,4 ovos; média de ovos/grama de fezes aos 60 dias no mesmo grupo = 568,2 ovos).

Essas taxas de redução do número de ovos parece ser um fenômeno independente da mortalidade dos vermes. Isso porque, essa concentração (que apresentou menor oviposição) teve, por sua vez, redução de vermes de apenas

17% com a FOEE enquanto que essa foi ausente com a F3, aos 45 dias de infecção, e, aos 60 dias, de 12,9% para a F3 e nula para a orgânica.

Os ensaios *in vitro* demonstraram que as amostras obtidas do refração da F3 (frações 3.5, 3.6 e 3.7-3.9) promoveram a formação de "protuberâncias" localizadas após o ovário das fêmeas, estando, essas alterações, relacionadas à diminuição da oviposição do verme durante o teste.

Sabe-se que a F3 foi obtida da FOEE. Por isso, tanto a FOEE como a F3 apresentariam compostos com atividade sobre a oviposição do verme. Quando a F3 foi refraçada, esses compostos poderiam estar presentes nas amostras F3.5, F3.6 e F3.7-3.9 que, quando isolados de outros, ampliou essa ação, gerando alterações mais intensas nos órgãos internos das fêmeas, perceptíveis nos ensaios *in vitro*.

De qualquer forma, pode-se inferir que tanto a FOEE como a F3 podem ter ação sobre os órgãos reprodutores das fêmeas diminuindo sua oviposição.

Estudos *in vivo* realizados com óleo essencial de cebola (*Allium cepa*) e de alho (*A. sativum*), com a concentração de 5 mg/kg, administrada 24 horas após a infecção dos camundongos e durante 5 dias consecutivos, em cepa egípcia de *S. mansoni*, demonstraram reduções de oviposição de até 82,15%. A alta porcentagem foi relacionada a também alta taxa de redução do número de vermes (de até 75,97% para *A. cepa*) (METWALLY, 2006).

Ensaio pré-clínico feito com extrato aquoso de *Clerodendrum umbellatum* (conhecido nos Estados Unidos por "umbel clerodendrum") - administrados após 60 dias de infecção e durante 14 dias seguidos em camundongos infectados com o parasito de cepa oriunda de Camarões - em que foram testadas diferentes concentrações (40, 80 e 160 mg/kg) mostraram índice de redução de ovos de até 85,14% e de vermes de até 100%, para a concentração mais alta. Nesse caso, foi considerado que tanto as taxas de redução de vermes como de ovos foram dose dependentes (JATSA *et al.*, 2009).

A diminuição da oviposição provocada pelas frações estudadas *in vivo* não foram (assim como para o parâmetro redução de vermes) dose dependente, ou seja, aumentando-se sua concentração não necessariamente ocorreu aumento da porcentagem de eficiência para redução no número de ovos.

Dentre as frações analisadas *in vivo* vale salientar que a F3, a partir da concentração de 100 mg/kg, demonstrou quantidade de ovos por grama de fezes inferior ao grupo controle, quando administrada aos 45 dias de infecção, diferindo significativamente para esse grupo, com todas as concentrações testadas.

Em relação ao PZQ, a concentração de 300 mg/kg administrada no 45º dia de infecção, apresentou maior redução da oviposição que as outras (81,1%). Esse tratamento demonstrou que a redução no número de ovos esteve relacionado à de vermes. Delgado *et al.* (1992), obtiveram redução de ovos de 99% para a concentração de 250 mg/kg, administrado aos 42 dias de infecção, para a linhagem BH, também relacionada redução de vermes (58,0%).

As taxas de redução da oviposição discutidas no presente trabalho foram baseadas no exame quantitativo das fezes (Kato-Katz). Cunha *et al.* (1987), no entanto, encontraram divergências nos resultados ao comparar os exames Kato-Katz (KATO & MIURA, 1954; KATZ *et al.*, 1972), Hoffman Pons & Janer (1934) e o oograma, sendo que o primeiro exame apresentou maiores taxas de cura. Por essa razão é importante empregar mais de um método para analisar alterações na oviposição.

Assim, o estudo do oograma, segundo Katz (2008), deve ser o preferido para avaliação das triagens, isso porque, esse método se baseia no fato de que em infecções experimentais balanceadas, a partir do 30º dia de infecção, os vermes iniciam a postura dos ovos ainda imaturos que levarão cerca de seis dias para amadurecer completamente. Fármacos ativos, que interrompam a postura dos ovos, irão mostrar o desaparecimento ou diminuição de ovos nos estágios imaturos de desenvolvimento (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

Para Pellegrino & Faria (1965), fármacos anti-*S. mansoni* produzem, na parede do intestino, uma mudança progressiva na porcentagem de ovos viáveis em diferentes estágios de maturidade que pode ser observado por meio do oograma. Essa mudança é produzida pela interrupção da oviposição ou por alterações no processo de maturação dos ovos. Esses autores sugerem, então, que modificações no oograma constituem num critério simples, sensível e seguro para avaliar a ação de fármacos contra este verme.

A maioria dos tratamentos realizados no presente trabalho, aos 45 dias de infecção, seja com PZQ, seja com as FOEE e F3, diminuiu significativamente a quantidade de ovos imaturos em relação ao grupo controle.

Pode-se observar que - especialmente a F3, a partir da concentração de 100 mg/kg - houve menor quantidade de ovos imaturos e maduros e maior de ovos mortos (assim como o PZQ - 300 mg/kg), quando administrada aos 45 dias de infecção. Como a quantidade de ovos mortos para essa concentração aumentou significativamente sobre o grupo controle negativo, referente a esse dia de tratamento (sendo que os únicos tratamentos que diferiram significativamente do grupo controle em relação aos ovos mortos foram os realizados com 100 e 200 mg/kg de F3), pode-se considerar que, dentre as amostras testadas, a F3 foi mais ativa *in vivo* para o parâmetro oviposição.

Sabe-se que apesar da oxaminiquina ser capaz de matar o parasito, esse fármaco não atua sobre os ovos que são capazes de liberar miracídios até 17 dias após o tratamento curativo. Por outro lado, já foi constatado que o praziquantel não atua sobre os ovos imaturos, nos tecidos e *in vivo* (MATSUDA *et al.*, 1983; DOS-REIS & ANDRADE, 1987). Assim, o encontro no oograma de maior quantidade de ovos mortos indicaria que a amostra testada teve ação sobre esse agente patogênico.

Araújo *et al.* (1999), testaram a ação *in vivo* do artesunato sobre a linhagem LE do verme. Constataram que a concentração de 300 mg/kg desse composto provocou alterações no oograma (ou seja, a ausência de um dos estágios de maturidade do ovo) quando administrado em dose única e por via oral,

45 dias após a infecção. Os camundongos foram eutanaziados 7 dias após realização do tratamento, obtendo 100% de oogramas alterados. Essa porcentagem diminuiu quando os animais foram necropsiados depois de 30 dias do tratamento (obtendo-se 25% de oogramas alterados) e após 60 dias (não se obteve alteração no oograma) indicando que houve retomada da oviposição após 60 dias de efetuado o tratamento.

Pesquisa pré-clínica realizada com o mirazid (extraído de myrrh), em camundongos infectados com a linhagem egípcia "CD" do parasito, administrado intragastricamente, 46 dias pós infecção, com a dose recomendada para tratamento da esquistossomose mansônica humana (500 mg/kg, durante 2 dias consecutivos) além de 250 mg/kg por 4 dias e de 125 mg/kg por 6 dias, não promoveram alterações no oograma. Tais tratamentos apresentaram maior quantidade de ovos imaturos, maduros e pouca de mortos, acreditando-se portanto, que esse fármaco possui baixa atividade para redução de oviposição (ABDUL-GHANI *et al.*, 2010).

Katz *et al.* (1989), observaram oogramas alterados em grupos tratados com PZQ 200 e 400 mg/kg, via oral, em camundongos infectados com *S. mansoni*, linhagem LE. No entanto, também foram detectadas recidivas a partir da terceira semana pós tratamento.

No presente trabalho não foi possível perceber se houve recidivas, já que a necropsia foi feita duas semanas após a administração das amostras e do fármaco.

Conforme discutido anteriormente nesse tópico, as FOEE e F3, em particular esta última, foi capaz de diminuir a oviposição de *S. mansoni*, porém, esse processo não esteve relacionado à redução da carga parasitária. Apesar disso, a interrupção na oviposição é importante uma vez que elimina o principal agente patogênico: o ovo. De acordo com Katz (2008) um fármaco anti-esquistossomose mansônica pode ser classificado como profilático (que irá prevenir a infecção por agirem nas formas imaturas do vermes - caso, por exemplo, dos derivados da artemisinina), supressor (capaz de acabar com a

postura das fêmeas, eliminando também a transmissão da parasitose) e curativas (que matam todos, ou quase, os vermes maduros, eliminando a infecção).

6.3.2.2 Ação das FOEE e F3 nas reações granulomatosas provocadas pelos ovos de *S. mansoni*

Vários autores relatam que outro critério importante para avaliar a ação de um fármaco ou de qualquer amostra sobre o *S. mansoni*, é a redução no número de ovos retidos nos tecidos, como o do fígado, por exemplo (LUTTERMOSE, 1954; THOMPSON *et al.*, 1962; LAMBERT & STAUFFER, 1964).

Assim, além da busca pela produção de um medicamento que pode ter atividade profilática, supressora ou curativa, uma quarta abordagem poderia ser a busca por um fármaco antipatologia, ou seja, que produziria a reversão das lesões já ocasionadas pelo parasito (KATZ, 2008).

A esquistossomose humana e experimental é uma doença sistêmica que pode comprometer vários órgãos como fígado, baço, órgãos hemolinfopoéticos, intestino, peritônio, pâncreas, pulmões, rins, órgãos reprodutores, medula espinal, sistema nervoso central, pele, órgãos do sentido, glândulas endócrinas e outros (RASO & BOGLIOLO, 1970). Contudo, a maioria dos estudos se concentra nas alterações hepáticas e intestinais (LENZI *et al.*, 2008).

Neste trabalho todas as amostras apresentaram alterações na quantidade de granulomas e no tamanhos desses, em relação ao grupo controle negativo, especialmente, as FOEE e F3, nas concentrações de 200 e 300 mg/kg, administradas no 45º dia de infecção.

Estudos realizados com o mirazid, apresentaram média de 14 granulomas por fígado analisado (para o grupo de camundongos tratados com 500 mg/kg, por 2 dias consecutivos, administrado após 46 dias de infecção), enquanto que o grupo controle negativo mostrou em média 23 granulomas. O tamanho desses foi de 239,22 µm de diâmetro e, o grupo controle, foi de 270,73 µm. Essas diferenças em relação ao grupo controle não foram significativas, propondo que esse fármaco, nesse esquema de tratamento, apresentou baixa atividade sobre as reações granulomatosas (ABDUL-GHANI *et al.*, 2010).

No presente trabalho, a maioria dos tratamentos apresentaram maior quantidade de granulomas, quando administrados aos 60 dias de infecção. Esse

fato pode ser explicado tendo como base estudos realizados por Atta *et al.* (1981) e Boros *et al.* (1975), que relataram picos na formação de reações granulomatosas após a 8ª e 10ª semana de infecção e declínio após a 12ª.

A diminuição da quantidade e tamanho das reações granulomatosas apresentadas pelo PZQ, em relação ao grupo controle negativo, pode ser explicada pelo fato de que esse fármaco promove a morte dos ovos logo após o tratamento do camundongo, diminuindo, dessa forma, os granulomas hepáticos (DOS-REIS & ANDRADE, 1987).

A explicação para o fato das FOEE e F3 terem atuado nas reações granulomatosas seria que, de acordo com Domingo & Warren (1968) e Smithers & Doenhoff (1976), a modulação do tamanho do granuloma é dependente de uma "dessensibilização endógena" do hospedeiro, ou seja, a diminuição do tamanho dessas reações inflamatórias coincide com o declínio de outros parâmetros da resposta imune mediada por células.

Sabe-se que *C. verbenacea*, apresenta propriedades anti-inflamatórias e essa pode ser uma razão pela qual as frações testadas apresentaram-se eficazes na diminuição da formação dos granulomas, reduzindo sua quantidade e tamanho em relação ao grupo controle negativo e, por vezes, ao PZQ. A atividade anti-inflamatória do EE para *C. verbenacea* já foi relatada por Oliveira (2002), demonstrando que as substâncias anti-edematogênicas desta espécie podem ser extraídas principalmente por solventes de média polaridade, uma vez que esse estudo demonstrou que edemas de pata induzidos pela carragenina foram reduzidos com os extratos etanólico e diclorometânico.

6.3.3 Ação das FOEE e F3 sobre o peso corporal e hepatoesplenomegalia.

A principal patologia da esquistossomose mansônica ocorre no fígado, como conseqüência do aporte de ovos a esse órgão. Assim, observa-se que a infecção por *S. mansoni* geralmente causa hepatomegalia além de esplenomegalia. Frente a esses dados, realizou-se a pesagem do fígado e do baço para investigar o impacto do tratamento com as FOEE e F3 sobre estes órgãos.

De acordo com os resultados obtidos, as frações testadas provocaram, na maioria dos tratamentos, perda de peso corporal em relação ao grupo de camundongos sadios (não infectados) e diminuição (nem sempre significativa) do peso do fígado e baço dos animais tratados em comparação aos camundongos do grupo controle infectados e não tratados.

Em especial, o tratamento realizado com 200 mg/kg de F3 e PZQ demonstraram diminuição do peso do fígado, em relação ao grupo controle não tratado, e não apresentaram diferença significativa para esse parâmetro sobre o grupo de camundongos sadios, podendo indicar uma normalização do peso desse órgão.

Dados discutidos anteriormente (no tópico 5.2.1.2) evidenciaram que a concentração de 200 mg/kg de F3 e PZQ diminuíram a quantidade e tamanho dos granulomas hepáticos sobre o grupo controle negativo, estando relacionado à diminuição do peso do fígado. Além disso, conforme visto no tópico 5.3.2.1, a porcentagem de redução de ovos eliminados com as fezes foi alta para as frações testadas, com essa mesma concentração.

Esses fenômenos, diminuição da oviposição, das reações granulomatosas no fígado (em tamanho e quantidade) e do peso desse órgão - ou seja, da hepatomegalia - estão portanto, relacionados entre si. De acordo com Cheever *et al.* (1983) uma redução na carga parasitária dos vermes ou da deposição de ovos

no tecido hepático está interligada com um menor número de reações granulomatosas e conseqüente deposição de fibrose.

Muitas vezes, uma amostra testada contra *S. mansoni* pode apresentar atividade parasiticida ou interferir na capacidade de oviposição das fêmeas e não estar vinculadas à alterações dos parâmetros patológicos (SANTOS, 2010). No presente trabalho percebe-se que a F3 (200 mg/kg) atuou tanto no parasito, como na patologia.

Pesquisa realizada com dexametasona (glicocorticóide de grande ação anti-inflamatória), sobre camundongos isogênicos infectados com *S. mansoni* linhagem BH, obteve-se resultados parecidos com o presente trabalho, com ligeira diminuição do peso corporal, do fígado e do baço nos grupos tratados (RAMOS, 2004). Estudo feito com *Clerodendrum umbellatum* também revelaram diminuição do peso do fígado e do baço em animais tratados com o extrato aquoso dessa planta, em relação ao grupo controle infectado (JATSA *et al.*, 2009). Esses resultados, segundo os autores, seriam decorrentes das propriedades anti-inflamatórias das amostras testadas, o que poderia também explicar os resultados obtidos com *C. verbenacea*.

Tratamento realizado com 100 mg/kg de PZQ, administrado por 5 dias, e com a mesma concentração de oxaminiquina, administrada em dose única em camundongos, sobre a linhagem do Vale do Ribeira (São Paulo - Brasil), demonstraram ganho de peso corporal em comparação ao grupo controle infectado, porém, não tratado. Esse dado foi indicativo de que os camundongos do grupo controle infectados apresentaram menor desenvolvimento do que os tratados e sadios (FIGUEIREDO, 1991).

Por fim, no presente trabalho as concentrações testadas de PZQ aumentaram, da mesma forma, o peso corporal dos camundongos em relação ao grupo controle infectado e, na maioria dos tratamentos com esse fármaco, a diferença de peso não foi estatisticamente significativa em comparação ao grupo de animais sadios. Por outro lado, o grupo controle também pareceu apresentar menor desenvolvimento que os camundongos sadios.

6.3.4 Ação das FOEE e F3 sobre o tegumento de adultos de *S. mansoni* após ensaios *in vivo*.

Conforme discutido no tópico 5.1.3, a superfície do *S. mansoni* é formada por duas bi-camadas lipídicas muito próximas e opostas, na forma de uma membrana plasmática (HOCKLEY & McLAREN, 1973). Como o tegumento não possui membranas laterais, seu citoplasma se estende na forma de uma unidade contínua, ou sincício, ao redor do corpo do verme. Além de proteção, esse complexo sincicial é especializado para absorção, secreção e atuação como sítio das ações imunológicas do hospedeiro (SHUHUA *et al.*, 2000).

O tegumento das espécies de *Schistosoma* constitui, portanto, num dos principais alvos quimioterápicos. Muitos dos compostos que são utilizados atualmente na terapêutica clínica, causam alterações morfológicas no tegumento do verme.

O praziquantel, por exemplo, provoca danos extensos no tegumento de adultos de *S. mansoni* (BECKER *et al.*, 1980). As alterações morfológicas produzidas por esse fármaco são acompanhadas por um aumento da exposição de antígenos na superfície do verme que são identificados e conectados com a resposta imune do hospedeiro requerida para complementar a atividade do fármaco (DOENHOFF *et al.*, 1987; BRINDLEY *et al.*, 1989), provocando o rompimento da superfície do parasito, seguido de sua morte (BRICKES *et al.*, 1983).

A oxaminiquina é capaz de provocar alterações estruturais ao nível do tegumento de *S. mansoni* (KHON *et al.*, 1982), sendo observadas vacuolização, destruição dos tubérculos nos vermes machos e erosão da superfície do tegumento (MAGALHÃES-FILHO *et al.*, 1987).

O óleo essencial de alho (*A. sativum*) provoca perfurações nos tubérculos e alterações nos espinhos, ulcerações e formação de vesículas e bolhas nos vermes machos (LIMA, 2011).

Já foram observadas alterações tegumentares como erosão, perda de tubérculos nos machos, formação de vesículas e colapso do tegumento nos

vermes adultos e esquistossômulos quando submetidas a tratamento com artemisinina e ácido artesúnicos (ARAÚJO *et al.*, 1999; SHUHUA *et al.*, 2000; UTZINGER *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2006).

Normalmente, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura referentes à ação de amostras com potencial esquistossomicida, são feitas a partir de testes *in vitro*. Conforme discutido anteriormente, nem sempre há correlação entre ensaios *in vitro* e *in vivo*. Por isso, no presente trabalho se optou por fazer a análise do tegumento do verme, através da microscopia eletrônica de varredura, em ensaios *in vivo*.

De acordo com as imagens obtidas percebe-se que as FOEE e F3 apresentaram ação no tegumento dos vermes, provocando alteração e destruição do mesmo, mais intensas que o PZQ. Também mostraram a adesão de células leucocitárias do hospedeiro no tegumento do mesmo.

Os danos no tegumento dos machos foram mais extensos do que no das fêmeas, para as frações testadas. De acordo com o tópico 5.3.1, as FOEE e F3 tiveram ação preferencial por fêmeas durante os testes *in vivo*. Isso pode indicar que a atividade exercida pelas frações no verme podem diferir conforme o sexo do parasito. Esses dados sugerem, portanto, que o alvo de ação das amostras possa ser, nos machos, o tegumento, e nas fêmeas, outro, como por exemplo, as estruturas internas. Tais resultados corroboram com os obtidos com os testes *in vitro*, em que foi observado maior freqüência de alterações tegumentares nos vermes machos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Ensaio *in vitro*

- Os ensaios *in vitro* demonstraram que as amostras de maior atividade esquistossomicida foram a FOEE e a F3. Além de apresentarem maior atividade contra a sobrevivência de adultos de *S. mansoni* (agindo preferencialmente sobre os machos), diminuírem a oviposição pelas fêmeas e terem menores DLs 50 e 90 em relação às outras amostras, também apresentaram boa solubilidade na solução PBS. Assim, foram escolhidas para dar continuidade aos testes *in vivo*.
- O composto artemetina esteve relacionado à diminuição da oviposição, de acordo com dados obtidos nos testes *in vitro*.

- Ensaio *in vivo*

- As FOEE e F3, principalmente a FOEE 300 mg/kg, promoveram *in vivo* deslocamento dos vermes em direção ao fígado em virtude da ativação do mecanismo de escape desses frente às amostras. Esse deslocamento não esteve relacionado à mortalidade dos vermes.
- Diferentemente dos testes *in vitro*, os ensaios *in vivo* mostraram que as amostras tiveram ação preferencial por fêmeas, atestando que nem sempre há correspondência entre ambos os ensaios.
- As FOEE e F3 apresentam atividade sobre a oviposição das fêmeas *in vivo*. Esse fenômeno, porém, não está relacionado a mortalidade dos vermes.
- De acordo com dados obtidos *in vitro* e *in vivo*, as frações testadas podem atuar no sistema reprodutor das fêmeas, diminuindo sua oviposição.
- A F3 demonstrou no oograma ser ativa para os ovos de *S. mansoni*, uma vez que foi encontrada grande quantidade de ovos mortos nesse exame. Poucos fármacos esquistossomicidas conseguem atuar sobre os ovos do parasito.

- As FOEE e F3 tiveram ação sobre as reações granulomatosas em diferentes órgãos, especialmente no fígado, onde diminuíram a quantidade e o tamanho dessas.
- As FOEE e F3 foram capazes de diminuir a hepatomegalia dos camundongos infectados. Esse resultado indica que tais frações atuam também na patologia da esquistossomose mansônica.
- As FOEE e F3 foram capazes de provocar, *in vivo*, alterações tegumentares nos machos de *S. mansoni*, mais extensas que nas fêmeas, propondo que o mecanismo de ação pode diferir entre o sexo do parasito.
- A concentração mais ativa, *in vivo*, para as FOEE e F3 foi a de 200 mg/kg em virtude, principalmente, da baixa oviposição apresentada pelas fêmeas do parasito.
- As FOEE e F3 mostraram-se mais ativas quando administradas no 45º dia de infecção para a maioria dos parâmetros analisados.
- Por vezes, as FOEE e F3 demonstraram maior atividade que o PZQ. Isso é importante, pois o PZQ constitui numa substância pura, com seu princípio ativo já definido e isolado, o que não existe ainda para as frações de *C. verbenacea*. Uma vantagem do estudo dessas frações com o objetivo de se elaborar um fitoterápico para o tratamento da esquistossomose mansônica, é que essas contém vários compostos e, a junção desses, pode reduzir a resistência do verme que vem sendo relatada com o uso do fármaco padrão.
- A FOEE e F3 apresentaram atividade parecida e, portanto, perspectivas futuras indicariam a necessidade de se otimizar o refração da FOEE, visando obter o isolamento e a identificação de compostos com atividade anti-*S. mansoni*, visto que, no presente trabalho, ficou comprovada que a espécie *C. verbenacea* possui atividade contra o parasito e também contra a patologia por ele causada.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SHETA, M.; HASSAN, A. 2010. Efficacy of low-dose myrrh protocols in the treatment of experimental schistosomiasis mansoni: hepatic improvement without parasitologic cure. **Research and Reports in Tropical Medicine**. 1: 65-71.

ABDULLA, M. H.; LIM, K. C.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. 2007. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Medicine**. 4: 130-138.

ADEWUNMI, C. O. & OJEWOLE, J. A. O. 1985. **Effects of oxamniquine on neuromuscular transmission**. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 275: 231-237.

ALLEGRETTI, S. M.; OLIVEIRA, C. N. F.; OLIVEIRA, R. N.; FREZZA, T. F.; REHDER, V. L. G. 2011. The use of brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*. In: GRGUR, D. **Schistosomiasis**, InTech Open Access Publisher: Rijeka.

ALMEIDA-MACHADO, P. 1982. The Brazilian program for schistosomiasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 31: 76-86.

ALONSO, J. R. 1998. **Tratado de fitomedicina**, ISIS Edicione S. R. S.: Buenos Aires.

ANDREWS, P. 1981. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. **Arzneimittelforschung**. 31: 538-541.

ANDREWS, P.; THOMAS, H.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. 1983. Praziquantel. **Medicinal Research Reviews**. 32: 147-200.

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

- AMARAL, R. S. & PORTO, M. A. S. 1994. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 27: 73-90.
- ANARUMA-FILHO, F.; SANTOS, R. F., SANT'ANA, J. M. 2007. Indicadores da relação entre estrutura da paisagem, degradação ambiental e esquistossomose mansoni. **VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu: Minas Gerais.
- ARAGON, A. D.; IMANI, R. A.; VINT, R. B.; PAULINE, M. C.; MELMAN, S. D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E. S.; CUNNINGHAM, C. 2009. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 164: 57-65.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. 1991. Activity of the artemether in experimental *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 86: 185-188.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. 1999. Avaliação terapêutica do artesunato na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 32:7-12
- ATHANASIADOU, S. & KYRIAZAKIS, I. 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**. 63: 631–639.
- ATTA, A. M.; MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; PAREJA, G. 1981. Esquistossomose mansônica. I. Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. **Revista de Saúde Pública**. 15: 72-92.
- BAARD, A. P.; SOMMERS, D. K.; HONIBALL, P. J.; FOURIE, E. D.; DU TOIT, L. E. 1979. Preliminary results in human schistosomiasis with Ro 11-3128. **South African Medical Journal**. 55: 617-618.
- BADRIA, F.; ABOU-MOHAMED, G.; EL-MOWAFY, A.; MASSOUD, A.; SALAMA, O. 2001. Mirazide: a new schistosomicidal drug. **Pharmaceutical Biology**. 39: 127-131.

- BARAKAT, R.; ELMORSHEDY, H.; FENWICK, A. 2005. Efficacy of myrr in the treatment of human *schistosomiasis mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 73: 365-367.
- BARKER, L. R.; BUEDING, E.; TIMMS, A. R. 1966. The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. **British Journal of Pharmacology**. 26: 656-665.
- BARREAU, M.; COTREL, C.; JEANMART, C. 1977. 1,2-Dithiolethiones. **Chemical Abstracts**. 87: 593.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RODRIGUES, V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 38: 423-426. 1996.
- BASSILY, S.; FARID, Z.; DUNN, M.; EL-MARSY, N. A.; STEK, M. Jr. 1985. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 79: 629-634.
- BAYEUX, M. C.; FERNANDES, A. T.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 1229-1232.
- BECKER, B.; MEHLHORN, H.; ANDREWS, P.; ECKERT, J. 1980. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vivo*. **Parasitology Research**. 63: 113-128.
- BECKMAN, S. & GREVELDING, C. G. 2010. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni in vitro*. **International Journal for Parasitology**. 40: 521-526.
- BENNET, J. & BUEDING, E. 1971. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 39: 859-867.

- BERGE, S. T.; KABATEREINE, N.; GUNDERSEN, S. G.; TAYLOR, M.; KVALSIG, J. D.; MKHIZE-KWITSHANA, Z.; JINABHAI, C.; KJETLAND, E. F. 2011. Generic praziquantel in South Africa: the necessity for policy change to provide cheap, safe and efficacious schistosomiasis drugs for the poor, rural population. **Southern African Journal of Epidemiology and Infection**. 26: 22-25.
- BLANC, F. & NOSNY, Y. 1968. Le traitement des schistosomes par les injections de 2-dehydro-emetine. **La Presse Médicale**. 76: 1419-1420.
- BOROS, D. L.; PELLEY, R. P.; WARREN, K. S. 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. **The Journal of Immunology**. 114: 1437-1441.
- BOUREE, P. 1991. Successful treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* by single oral dose of praziquantel. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 21: 303-307.
- BOUT, D. T.; DESLÉE, D.; CAPRON, A. 1986. Antischistosomal effect of cyclosporin A: cure and Prevention of mouse and rat schistosomiasis mansoni. **Infection and Immunity**. 52: 823-827.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; COIMBRA, E. S. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 111: 396-402.
- BRAGUINE, C. G.; COSTA, E. S.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. 2009. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Zeitschrift für Naturforschung**. 64: 793-797.
- BRICKLE, Q. D. & ANDREWS, B. J. 1985. Resistance following drug attenuation (Ro 11-3128 or oxamniquine) of early *Schistosoma mansoni* infections in mice. **Parasitology**. 90: 325-338.

- BRINDLEY, P. J. 1994. Drug resistance to schistosomicides and other antihelmentics of medical significance. **Acta Tropica**. 56: 213-231.
- BRINDLEY, P. J.; STRAND, M.; NORDEN, A. P.; SHER, A. 1989. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 34: 99-108.
- BRICKES, C. S., DEPENBUSCH, J. W.; BENETT, J. L.; THOMPSON, D. F.. 1983. The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. **Parasitology Research**. 69: 61-67.
- BUENDING, E. & PENEDO, N. 1957. Effects of alkyldibenzylamines on *Schistosoma mansoni*. **Federation Proceedings of the American Society of Experimental Biology**. 16: 286.
- BUEDING, E.; BATZINGER, R.; PETTERSON, G. 1976. Antischistosomal and some toxicological properties of a nitrodiphenylaminoisothiocyanate (C 9333-Go/CGP 4540). **Experientia**. 32: 604-606.
- BUEDING, E.; HAWKINS, J.; CHA, Y. N. 1981. Antischistosomal effects of cyclosporin A. **Agents and Actions**. 11: 380-383.
- BUEDING, E.; DOLAN, P.; LEROY, J. P. 1982. The antischistosomal activity of oltipraz. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**. 37: 293-303.
- BRENER, Z. 1960. Quimioterapia da esquistossomose experimental. II Observações sobre a atividade terapêutica do cloridrato de glucosamina. **O Hospital**. 57: 1069-1073.
- CABARET, J.; BOUILHOL, M.; MAGE, C. 2002. Managing helminths of ruminants in organic farming. **Veterinary Research**. 33: 625–640.
- CAFFREY, C. R. 2007. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**. 11: 433–439.

- CALIXTO, J. B. & SIQUEIRA-Jr. 2008. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. 78 (supl: 1): 98-106.
- CAMACHO M.; TARRAB-HAZDAI, R.; EZPINOZA, B.; AMON, R.; AGNEW, A. 1994. The amount of acetylcholinesterase on the parasite surface reflects the differential sensitivity of schistosome species to metrifonate. **Parasitology**. 108:153–160.
- CASTAGNA, C. L. 2010. **Medida da vulnerabilidade ambiental para esquistossomose mansoni em função da estrutura da paisagem**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, UNICAMP, Campinas-SP.
- CERF, J.; LEBRUN, A.; DIERICKX, J. 1962. A new approach to helminthiasis control: the use of an organophosphorus compound. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 11: 514-517.
- CHADIWANA, S. K.; TAYLOR, P.; MAKURA, O. 1987. Prevalence and distribution of the *Schistosoma mattheei* in Zimbabwe. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**. 67: 167-172.
- CHEEVER, A. W.; DUNN, M. A.; DEAN, D. A.; DUVALL, R. H. 1983. Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/ 6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 32: 1364-1369.
- CHEN, D. J.; FU, L. F.; SHAO, P. P.; WU, F. Z.; FAN, C. Z.; SHU, H.; REN, C. S.; SHENG, X. L. 1980. Studies on antischistosomal activity of qinghaosu in experimental therapy. **Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi**. 80: 422-428.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**. 77: 41-51.
- CHRISTOPHERON, J. B. 1918. The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **The Lancet**. 192: 325-327.

- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; MORONI, R. 1992. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Experimental Parasitology**. 75: 425-432.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. 1993. Drug resistance in schistosomes. **Parasitology Today**. 9: 162-166.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? **Pharmacology and Therapeutics**. 68: 35-85.
- CIOLI, D. & PICA-MATTOCCIA, L. 2002. Praziquantel. **Parasitology Research**. 90: S3-S9.
- COELHO, P M. Z. & PEREIRA, L. H. 1991. *Schistosoma mansoni*: preclinical studies with 9-acridanone-hydrazones in *Cebus* monkeys experimentally infected. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 33: 50-57.
- COLES, G. C.; MUTAHI, W. T.; KINOTI, G. K.; BRUCE, J. I.; KATZ, N. 1987. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 81: 782-785.
- COURA, J. R. & AMARAL. 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99 (Supl I): 13-19.
- COSTA, M. S. V. L. F. 2007 **Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do mucuri, MG. Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte-MG.
- CUNHA, A. S. 1982. Avaliação terapêutica da oxamniquine na esquistossomose mansoni humana pelo método do oograma por biópsia de mucosa retal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 24: 88-94.
- DA-SILVA, S. P. & NOEL, F. 1995. Time-course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment *in vitro*: comparison with its effects on worm length and motility. **Parasitology Research**. 81: 544-548.

- DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. 2007. Parasitic diseases: lyposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery**. 59: 505-521.
- DAVIS, A. & BAILEY, D. R. 1969. Metrifonate in urinary schistosomiasis. **Bulletin of the World Health Organization**. 41: 209-224.
- DAVIS, A.; BILES, J. E.; ULRICH, A., M. 1979. Initial experiences with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma haematobium*. **Bulletin of the World Health Organization**. 57: 773-779.
- DAVIS, A. 1993. Antischistosomal drugs and clinical practice. *In*: JORDAN, P.; WEBBE, G.; STURROCK, R. F. (editores) **Human Schistosomiasis**, 367-404. CAB International: United Kingdom.
- DAY, T. A.; BENNETT, J. L.; PAX, R. A. 1992. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**. 8: 342-344.
- DE-CARVALHO, Jr.; RODRIGUES, P. M.; SAWAYA, R. F.; MARQUES, A. C.; SHIMIZU, M. O. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**. 95: 297-301.
- DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. 1992. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. **Parasitology Research**. 78: 648-654.
- DOENHOFF, M. J.; SABAHA, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. 1987. Evidence for a immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 81: 947-951.

- DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. 2008. Praziquantel: mechanism of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 21: 659-667.
- DOMINGO, E. O. & WARREN, E. S. 1967. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. **The American Journal of Pathology**. 51: 757-767.
- DOS-REIS, M. G. & ANDRADE, Z. 1987. Efeito da quimioterapia sobre os ovos do *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82: 161-165.
- EISSA, M. M.; EL-AZZOUNI, M. Z.; AMER, E. I.; MADDOUR, N. M. 2010. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **International Journal for Parasitology**. 41: 235-242.
- EL-KOUNI, M. H.; DIOP, D.; CHA, S. 1983. Combination therapy of schistosomiasis by tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5' -monophosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 80: 6667-6670.
- EL BAZ, M. A.; MORSY, T. A.; EL BANDARY, M. M.; MOTAWEA, S. M. 2003. Clinical and parasitological studies on the efficacy of Mirazid in treatment of schistosomiasis haematobium in Tatoon, Etsa Center, El Fayoum Governorate. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 33: 761-767.
- EL SHENAWY, N. S.; SOLIMAN, M. F. M.; REYAD, S. I. 2008. The effect of antioxidant properties of aqueous extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 50: 29-36.
- EL-RIDI, R.; OZAKI, T.; INABA, T.; ITO, M.; KAMIYA, M. 1997. *Schistosoma mansoni* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo*: individual, parasite age and host dependent variations. **International Journal of Parasitology**. 27: 381-387.
- EL-RIDI, R.; ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA, H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S. H.; FAHMY, O. M. 2010. *In vitro* and *in vivo* activities of

arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 54: 3383-3389.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**. 82: 139-146.

FALLON, P. G. & DOENHOFF, M. J. 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 53: 61-62.

FALLON, P. G.; SMITH, P.; NICHOLLS, T.; MODHA, J.; DOENHOFF, M. J. 1994. Praziquantel induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. **Parasite Immunology**. 16: 529-535.

FALLON, P. G.; STURROCK, R. F.; NIANG, A. C.; DOENHOFF, M. J. 1995. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 53: 61-62.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ATUNES, C. A. P.; TAVARES, A. S.; CUNHAS, A. S. 2003. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**. 81: 190-196.

FETTERER, R. H.; PAX, R. A.; BENNETT, J. L. 1980. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Pharmacology**. 64: 31-38.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; TOMMASINI, S. 1995. Leaf extracts of some cordia species analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco**. 50: 245-256.

- FIGUEIREDO, A. C. 1991. **Estudo de características biológicas e morfológicas de cepa paulista de *Schistosoma mansoni* do Vale do Ribeira**. Tese, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP.
- FIGUEREIDO, G. M.; LEITÃO-FILHO, H. F.; BEGOSSI, A. 1997. Ethnobotany of AtlanticForest coastal communities: II. Diversity of plant uses at Sepetiba bay (SE Brazil). **Human Ecology**. 25: 353-360.
- FONTANILLES, F. 1969. Risks versus benefits in antischistosomal therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 160: 811-820.
- FOSTER, R. & CHEETHAM, B. L. 1973. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK – 4271). I: activity in rodents and in vitro. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 67: 674-684.
- FOSTER, R. 1987. A review of clinical experience with oxamniquine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 81: 55-59.
- FRÉZARD, F. & MELO, A. L. 1997. Evaluation of the schistomicidal efficacy of liposome – entrapped oxamniquine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 39: 97-100.
- FRIPP, P. J. 1967. Histochemical localization of esterase activity in schistosomes. **Experimental Parasitology**. 21: 380-390.
- FROHBERG, H. Results of toxicological studies on praziquantel. **Arzneimittelforschung**. 1984. 34: 1137-1144.
- FUNARI, C. S. & FERRO, V. O. 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15: 178-182.
- GENTILINI, M.; DUFLO, B.; RICHARD-LENOBLE, D.; BRIICKER, G.; DANIS, M.; NIEL, G.; MEUNIER, Y. 1980. Assessment of 35972 (Oltipraz) a new antischistosomal drug against *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, and *Schistosomu intercalatum*. **Acta Tropica**. 37: 271-274.

- GIANUTSOS, G. & BENNET, J. L. 1977. The regional distribution of dopamine and norepinephrine in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 58: 157-159.
- GRAY, D. J.; McMANUS, D. P.; LI, Y. S.; WILLIAMS, G. M.; BERGGUIST, R.; ROSS, A. G. 2010. Schistosomiasis elimination lessons from the past guide the future. **The Lancet Infectious Diseases**. 10: 733-736.
- GREENE, D. A. 1993. Gold, frankincense, myrrh, and medicine. **North Carolina Medinina Journal**. 54: 620-622.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. 2006. Human schistosomiasis. **Lancet**. 368: 1106-1118.
- GONNERT, R. & VOGEL, H. 1955. Dependence on host and parasite strain of the successful therapy of experimental schistosomiasis. **Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie**. 6: 193-195.
- GONNERT, R. & ANDREWS, P. 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Parasitology Research**. 52: 129-150.
- GUSTAFSSON, M. K. S. 1987. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the nervous system of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**. 74: 168-174.
- HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G. C.; KUSEL, J. R.; TCHUEM-TCHUEM, L. A. 2004. Schistosomiasis control: keep talking the tablets. **Trend in Parasitology**. 20: 92-97.
- HARDER, A. 2002. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitology Research**. 88: 395-397.
- HARNETT, W. & KUSEL, J. 1986. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. **Parasitology**. 93: 401-405.
- HERMETO, M. V.; BICALHO, R. S.; SILVA, R. E.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. 1994. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with

- dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 36: 99-103.
- HILMAN, G. R. & SENFT, A. W. 1973. Schistosoma motility measurements: response to drugs. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 185: 177-184.
- HODGE, H. C. & STERNER, J. H. 1949. Tabulation of toxicity classes. American Industrial Hygiene Association. 10: 92-96.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. 1934. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health**. 9: 281-298.
- HOOCKLEY, D. J. & D. J. MCLAREN. 1973. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **The Journal of Parasitology**. 3: 13-25.
- HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; ERLICH-SACHS, S.; SACHS, J. D. 2006. Incorporation a rapid-impact for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Medicine**. 3: S102.
- HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FERWICK, A.; KUMARESAN, J.; ERLICH-SACHS, S.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, J. D. 2007. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**. 357: 1018-1027.
- HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FERWICK, A.; SAVIOLI, L.; TAKEUCHI, T. 2008. A global fund to fight neglected tropical diseases: is teh G8 Hokkaido Toyako 2008 summit ready? **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2: S220.
- HUBEI NITHIOCYAMINUM COORDINATION RESEARCH GROUP. 1980. Clinical studies on 4022 cases of schistosomiasis japonica treated with nithiocyanminun. **National Medical Journal of China**. 60: 679-682.
- HULBERT, P. B.; BUEDING, E.; ROBINSON, C. H. 1973. Structure and antischistosomal activity in the nitrofurans series. Requirement for a 5-nitro-2-furyl-

vinyl moiety based on comparison of 3-(s-nitro-2-furyl)-substituted propionic, acrylic, and propiolic acid derivatives? **Journal of Medicinal Chemistry**. 16: 72-78.

IMS RETAIL DRUG MONITOR. 2007. **IMS RETAIL DRUG MONITOR -February 2007**. Disponível em: <http://portal.imshealth.de/sixcms/media.php/16/IMS%20Retail%20Drug%20Monitor%20February07.pdf>.

ISHIZAKI, T.; KAMO, E.; BOEHME, K. 1979. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. **Bulletin of the World Health Organization**. 57: 787-791.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. 1996. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 55: 214-218.

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

JACKSON, F. & COOP, R. L. 2000. The development of Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Parasitology**. 120: 95-107.

JATSA, H. B.; NGO SOCK, E. T.; TCHUEM TCHUENTE, L. A.; KAMTCHOUING, P. 2009. Evaluation of the in vivo activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. 6: 216-221.

JEWSBURY, J. M.; COOKE, M. J.; WEBER, M. C. 1977. Field trial of metrifonate in the treatment and prevention of schistosomiasis infection in man. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 71: 67-83.

- JEZIORSKI, M. C. & GREENBERG, R. M. 2006. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **International Journal of Parasitology**, 36: 625-632.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. 2006. *Schistosoma mekongi*: the *in vitro* effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. **Experimental Parasitology**. 113: 16-23.
- JORGE, S. G. 2011. Varizes Gastroesofágicas. *In*: **HepCentro**, 17/11/2011. Disponível em: <http://hepcentro.com.br/varizes.htm>.
- KAMEL, E. G.; EL-EMAM, M. A.; MAHMOUD, S. S. M.; FOU DA, F. M.; BAYAUMY, F. E. 2010. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercarial infectivity to albino mice by methanol extract of some plant species. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 98: 342-348.
- KAMEL, E. G.; EL-EMAM, M. A.; MAHMOUD, S. S. M.; FOU DA, F. M.; BAYAUMY, F. E. 2011. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosoides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. **Parasitology International**. *In press*.
- KAPP, K.; COUSTAU, C.; WIPPERSTEG, V.; JOURDANE, J.; KUNS, W.; GREVELDING, C. G. 2003. Transplantation of *in vitro*-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Bimphalaria glabrata*. **Parasitology Research**. 91: 482-485.
- KATO, K. & MIURA, M. 1954. Comparative examinations. **Japanese Journal of Parasitology**. 3: 35.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 14: 397-400

- KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. 1973. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 7: 381-387.
- KATZ, N.; ROCHA, R.; CHAVES, A. 1979. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. **Bulletin of the World Health Organization**. 57: 781-785.
- KATZ, N.; ROCHA, R.; CHAVES, A. 1984. Assessment of oltipraz in schistosomiasis mansoni clinical trials. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo**. 26: 147-151.
- KATZ, N.; DIAS, P. E.; SOUZA, C. P.; BRUCE, J. I.; COLES, G. C. 1989. Rate of action of schistosomicides in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 22: 183-186.
- KATZ, N. & ALMEIDA, K. 2003. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**. 55: 38-41.
- KATZ, N. 2008. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. *In*: CARVALHO, O. S.; COLEHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (editores) **Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar**, 823-847, Fiocruz: Rio de Janeiro.
- KEISER, J.; CHOLLET, J.; XIAO, S. H.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y.; UTZINGER, J.; TANNER, M. 2009. Mefloquine - an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 3: 1-11.
- KETZIS, J. K.; VERCRUYSSSE, J.; STROMBERG, B. E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.G.M. 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Veterinary Parasitology**. 139: 321-335.
- KIKUTH, W. & GONNERT, R. 1948. Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 42: 256-267.

- KING, C. H. 2009. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Tropica**. 113: 95-104.
- KINOTI, G. K. 1987. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2: 151-156.
- KNOBLOCH, J.; BECKMANN, S.; BURMEISTER, C.; QUACK, T.; GREVELDING, C. G. 2007. Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. 117: 318-336.
- KOHN, A.; LÓPEZ-ALVAREZ, M. L.; KATZ, N. 1982. Transmission and scanning electron microscopical studies in the tegument of male *Schistosoma mansoni* after oxamniquine treatment. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. 57: 285-291.
- KORTE, R.; SCHMIDT-EHRY, B.; KIELMANN, A. A.; BRINKMANN, U. K. 1986. Cost and effectiveness of different approaches to schistosomiasis control in Africa. **Tropical Medicine and Parasitology**. 37: 149-152.
- KRAMERS, P. G. N.; GENTILE, J. M.; GRYSEELS, B. J. M.; JORDAN, P.; KATZ, N.; MOTT, K. E.; MULYIHILL, J. J.; SEED, J. L.; FROHBERG, H. 1991. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs: is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. **Mutation Research**. 257: 49-89.
- KRISHNA, S.; BUSTAMANTE, L.; HAYNES, R. K.; STAINES, H. M. 2008. Artemisinin: their growing importance in medicine. **Trends in Pharmacological Sciences**. 29: 520-527.
- KUNTZ, A. N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SAYED, A. A.; CALIFF, L. L.; DESSOLIN, J.; ARMÉR, E. S.; WILLIAMS, D. L. 2007. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. **PLoS Medicine**. 4: 1071-1086.

- KUSEL, J. & HAGAN, P. 1999. Praziquantel – its use, cost and possible development of resistance. **Parasitology Today**. 15: 352-354.
- LAMBERT, C. R. & STAUFFER, P. 1964. Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infections with a nitrothiazole derivate, CIBA 32, 644-Ba. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 58: 292-303.
- LAMBERTUCCI, J. R. 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 105: 422-435.
- LE, W. J.; YOU, J. Q.; YANG, Y. Q.; MEI, J. Y.; GUO, H. F.; YANG, H. Z.; ZHANG, Z. W. 1982. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. **Acta Pharmaceutica Sinica**. 17: 187-193.
- LE, W. J.; YOU, J. Q.; MEI, J. Y. 1983. Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis. **Acta Pharmaceutica Sinica**. 18: 619-621.
- LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S.; MACHADO, M. P.; MOTA, E. M.; LENZI, J. A. 2008. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. *In*: CARVALHO, O. S.; COLEHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (editores) **Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar**, 569-654, Fiocruz: Rio de Janeiro.
- LEROY, J. P.; BARREANEAU, M.; COTREL, C.; JEANMART, C.; MESSER, M.; BENAZET, F. (1978). Laboratory studies of 35 972 RP, a new schistosomicidal compound. *In*: SIEGENTHALER, W. & LIITHY, R. (editores.), **Current Chemotherapy**, 148- 150, American Society for Microbiology: United States.
- LESCANO, S. Z.; CHIEFFI, P. P.; CANHASSI, R. R.; BOULOS, M.; AMATONETO, V. 2004. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Revista de Saúde Pública**. 38: 71-75.
- LI, Y. S.; CHEN, H. G.; HE, H. B.; HOU, X. Y.; ELLIS, M.; MCMANUS, D. P. 2005. A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China. **Acta Tropica**. 96: 184-190.

- LIANG, Y. S.; COLES, G.; DOENHOFF, M. J.; VAUGHAN, R. S. 2001. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**. 31:1227-1235.
- LIANG, Y. S.; WANG, W.; DAI, J. R.; LI, H. J.; TAO, Y. H.; ZHANG, J. F.; LI, W.; ZHU, Y. C.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J. 2010. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**. 84: 202-207.
- LIMA, A. C. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de praziquantel**. 2006. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP.
- LIMA, C. M. B. L. 2011. **Investigação da atividade antiparasitária do *Allium sativum* L. *in vitro* e *in vivo***. Laboratório de tecnologia farmacêutica, UFPB, João Pessoa-PB.
- LORENZ, W.; HENGLEIN, A.; SCHRADER, G. 1955. The new insecticide 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-l-hydroxyethylphosphonate. **Journal of the American Chemical Society**. 77: 2553-2554.
- LU, S. H., YAN, X. L.; LI, S. W.; SHI, J. F.; LIU, X.; YAN, X. H.; YAN, M. J.; LOU, J. L.; KUMAGAI, T.; WEN, L. Y. 2004. Prophylatic effect of artesunate against experimental infection of *Schistosoma mansoni*. **Chinese Journal of Parasitology Parasitic Diseases**. 22: 20-23.
- LU, S.H.; KUMAGAI, T.; QINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y.; SIWEN, L.; LIYONG, W.; MARUYAMA, H.; OTHA, N. 2006. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitology International**. 55: 63-68.
- LU, G.; HU, X.; HUANG, C.; LU, Y.; WU, L.; LIHUA, L.; XU, J.; YU, X. 2010. Effect of artmethers, hemin and Fe³⁺ on recombinant lactate dehydrogenase from *Schistosoma japonicum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 3: 930-933.

- LUTTERMOSER, G. W. 1954. Studies on the chemotherapy of experimental schistosomiasis. I. A method for detecting schistosomicidal activity based on response of *Schistosoma mansoni* infections in mice to Fuadin therapy. **The Journal of Parasitology**. 40: 130-137.
- MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA-Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. 25(3): 429-438.
- MAGALHÃES-FILHO A; MELO, M. E. B.; PADOVAN, P. A.; PADOVAN, P. P. 1987. *Schistosoma mansoni*: structural damage after treatment with oxamniquine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82: 347-352.
- MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B. C.; SOARES, C. S.; SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. 2009. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**. 104: 1197-1201.
- MAGALHÃES, L. G.; KAPADIA, G. J.; TONUCCI, L. R. S.; CAIXETA, S. C.; PARREIRA, N. A.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A. 2010. *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivates from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adults worms. **Parasitology Research**. 106: 395-401.
- MAHMOUD, M. R.; EL-ABHAR, H. S.; SALESH, S. (2002). The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 79: 1-11.
- MAINARDES, R. M. 2004. **Preparação e caracterização de nanopartículas de ácido poli (D, L-láctico – Co-Glicólico) contendo praziquantel**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP.
- MAIR, G. R.; MAULE, A. G.; DAY, T. A.; HALTON, D. W. 2000. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 121: 163-170.

- MANTAWY, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. 2011. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 53: 155-163.
- MARTINEZ, E. M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F.; MACHADO-SILVA, J. R.; REY, L. 2003. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (5): 557-564.
- MATOS, F. J. A. 1994. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais. Projeto para pequenas comunidades**. Editora UFC: Fortaleza.
- MATSUDA, H.; TANAKA, H.; NOGAMI, S.; MUTO, M. 1983. Mechanism of action of praziquantel on the eggs of *Schistosoma japonicum*. **Jaánese Journal of Experimental Medicine**. 53: 271-274
- MASSOUD, A. 1999. Efficacy of myrrh as a new schistosomicide. An experimental study. **Ain Shams Medicinal Journal**. 50: 1287-1298.
- METWALLY, N. S. 2006. Potency of *Allium sativum* and *Allium cepa* oils against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**. 23: 319-332
- MCKERROW, J. H. & SALTER, J. 2002. Invasion of skyn by *Schistosoma cercáriae*. **Trends in Parasitology**. 18: 193-195.
- MECCIA, G.; ROJAS, L. B.; VELASCO, J.; DÍAZ, T.; USUBILLAGA, A.; ARZOLA, J. C.; RAMOS, S. 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**. 4: 1119–1122.
- MEDINA, J. M.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, A. S.; HARAGUCHI, S. K.; FALAVIGNA, D. L. M.; ZAMUNER, M. L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. 2009. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 19: 207-211.

- MELHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; FRENKEL, J. K. 1981; *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. **Arzneimittelforschung**. 31: 544-554.
- MELO, N. I.; MAGALHAES, L. G.; CARVALHO, C. E.; WAKABAYASHI, K. A. L.; AGUIAR, G. P.; RAMOS, R. C.; MANTOVANI, A. L. L.; TURATTI, I. C. C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; CROTTI, A. E. M. 2011. Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **Molecules**. 16: 762-773.
- MELLIN, T. N.; BUSH, R. D.; WANG, C. C.; KATH, G. 1983. Neuropharmacology of the parasitic trematode, *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 32: 83-93.
- MENDONÇA-SILVA, D. L.; PESSÔA, R. F.; NOEL, F. 2002. Evidence for the presence of glutamatergic receptors in adult *Schistosoma mansoni*. **Biochemical Pharmacology**. 64: 1337-1344.
- MENDONÇA-SILVA, D. L.; GARDINO, P. F.; KUBRUSLY, R. C.. DE-MELLO, F. G.; NOEL, F. 2004. Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 129: 137-146.
- MESHNICK, S. R; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from erbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiol Reviews**. 60:301–315.
- METWALLY, N. S. 2006. Potency of *Allium sativum* and *Allium cepa* oils against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**. 23: 319-332.
- MICHIELIN, E. M. Z; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA-Jr. A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. 2009. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**. 100: 6615-6623.

- MICHIELIN, E. M. Z.; WIESSE, L. P. L.; FERREIRA, E. A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. 2011. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**. 56: 89-96.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2005. Esquistossomose mansônica. *In: Guia de vigilância epidemiológica - Esquistossomose mansônica - Série A: Normas e manuais técnicos 6ª ed.* 297-306. Ministério da Saúde: Brasília.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. **Situação epidemiológica da esquistossomose mansoni no Brasil.** 01.11.2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_2011.pdf.
- MITSUI, Y.; MIURA, M.; AOKI, Y. 2009. *In vitro* effects of artesunate on the survival of worms pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**. 83: 7-11.
- MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100: 205-211.
- MOLGAARDA, P.; NIELSEN, S. B.; RASMUSSEN, D. E.; DRUMOND, R. B.; MAKAZA, N.; ANDREASSEN, J. 2001. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. **Journal of Ethnopharmacology**. 74: 257-264.
- MOLYNEUX, D. H. 2008. Combating the "other diseases" of MDG 6 changing the paradigm to achieve equity and poverty reduction? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 102: 509-519.
- MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. 2010. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**. 127: 357-364.

- MORAES, J. 2011a. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. *In: Tropical Medicine Book*. InTech: Rijeka. *In press*.
- MORAES, J. 2011b. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. Tese, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo-SP.
- MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A. L.; McDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. 2009. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Medicine**. 6: S30.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. A.; PEREIRA, N. A. 2000. **Medicinal plants of Brazil**. Book News: Estados Unidos.
- MOSTAFA, O. M. S.; EID, R. A.; ADLY, M. A. 2011. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**, *in press*.
- NELSON, D. L. & PELLEGRINO, J. 1976. Experimental chemotherapy of schistosomiasis XI - Active derivatives of aminoethanethiosulfuric acids. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** vol. 18, no. 4, (July/August 1974), pp. 365-370.
- NEVES, J. K.; BOTELHO, S. P.; DE MELO, C. M.; PEREIRA, V. R.; DE LIMA, M. C.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M.C.; GALDINO, S. L. 2010. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**. 107: 531-538.
- NOEL, F. 2008. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. *In: CARVALHO, O. S.; COLEHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (editores) **Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar**, 823-847, Fiocruz: Rio de Janeiro.*
- NONTPRASERT, A.; PUKRITTAYAKAMES, S.; DONDORP, A. M.; CLEMENS, R.; LOOAREESUWAN, S.; WHITW, N. J. 2002. Neuropathologic toxicity of

- artemisinin derivatives in a mouse model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 67: 423-429.
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. 1999. Síntese do anti-helmíntico praziquantel , a partir da glicina. **Química Nova**. 22: 5-10.
- OLIVEIRA, M. C. B. L. 2002. **Atividade anti-inflamatória dos extratos obtidos de *Cordia verbenacea* DC**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas-SP.
- OLIVIER, L. & STIREWALT, M. A. 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**. 38: 19-23.
- PANDEY, A. V.; TEKWANI, B. L.; SINGH, R. L.; CHAUHAN, V. S. 1999. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. **The Journal of Biological Chemistry**. 274:19383–19388
- PARAENSE, W. L. 1966. *Biomphalaria amazonica* and *B. cousini*; two new species of Neotropical planorbid mollusc. **Revista Brasileira de Biologia**. 26: 115-126.
- PARAENSE, W. L. 1981. *Biomphalaria occidentalis* n. sp. from South America. **Memórias dos Instituto Oswaldo Cruz**. 76: 199-211.
- PARAENSE, W. L. 1986. Distribuição dos caramujos no Brasil, In: **Moderno conhecimentos sobre esquistossomose mansônica no Brasil**. REIS, F. A.; FARIA, I. & KATZ, N. (editores), 117-128, Academia Mineira de Medicina: Belo Horizonte.
- PARISE-FILHO, R. & SILVEIRA, M. A. B. 2001. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 37: 123-135.
- PARKER, M. 1992. Re-assessing disability: the impact of schistosomal infection on daily activities among women in Gezira province, Sudan. **Social Science and Medicine**. 35: 877-890.

- PARREIRA, N. A.; 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.; SILVA FILHO, A. A. 2010. Antiprotozoal, Schistosomicidal, na Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**. 7: 993-1001.
- PASSOS, G. F.; FERNADES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. 2006. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. 110: 323–333.
- PAX, R.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. 1978. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 304: 309-315.
- PAX, R. & BENNETT, J. L. 1991. Neurobiology of parasitic platyhelminths: possible solutions to the problems of correlating structure with function. **Parasitology**. 102: 531-539.
- PAYNE, L. & FITCHETT, J. R. 2010. Bringing neglected tropical diseases into the spotlight. **Trends in Parasitology**. 26: 421-423.
- PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 11: 201-215.
- PELLEGRINO, J. & FARIA, J. 1965. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 14: 363-369.
- PELLEGRINO, J & KATZ, N. 1968. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Advances in Parasitology**. 6: 233-290.
- PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; NELSON, D. L. 1999. Efficacy of a new schistosomicidal agent 2[(methylpropyl)amino]-1-octanethiosulfuric acid against an

- oxamniquine resistant *Schistosoma mansoni* isolate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 94: 811-813.
- PESSOA, R. F.; CASTRO, N. G.; NOEL, F. 2005. Binding of [3]MK-801 in subcellular fractions of *Schistosoma mansoni* evidence for interaction with nicotinic receptors. **Biochemical Pharmacology**. 69: 1509-1516.
- PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. 2004. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**. 34: 527-533.
- PICA-MATTOCCIA, L.; VALLE, C.; BASSO, A.; TROIANI, A. R.; VIGOROSI, F.; LIMERTI, P.; FESTUCCI, A.; CIOLI, D. 2007. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. **Experimental Parasitology**. 115: 344-351.
- PICA-MATTOCCIA, L.; RUPPEL, A.; XIA, C. M.; CIOLI, D. 2008. Praziquantel and the benzodiazepine Ro 11-3128 do not compete for the same binding sites in schistosomes. **Parasitology**. 135: 47-54.
- POPIEL, I. & ERASMUS, D. A. 1982. *Schistosoma mansoni*: teh survival and reproductive status of mature infections in mice treated with oxamniquine. **Journal of Helminthology**. 56: 257-261.
- POPIEL, I.; CIOLI, D.; ERASMUS, D. A. 1984. The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. **International Journal of Parasitology**. 14: 183-190.
- RAMOS, J. A. 2004. **Ações da desametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos**. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, UFRJ-Rio de Janeiro.
- RAISON, C. G. & STANDEN, O. D. 1955. The schistosomicidal activity of symmetrical diaminodiphenoxyalkanes. **British Journal of Pharmacology**. 10: 191-199.

- RASO, P. & BOGLIOLO, L. 1970. Patologia. *In*: CUNHA, A. S. (editor). **Esquistossomose mansônica**. Edusp: São Paulo.
- REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. 2007. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C.; MENTS, A. L.; PETROVICK, P. R. (editores), **Farmacognosia - da planta ao medicamento 6ª ed.**, 45-74, Editora UFRGS: Porto Alegre/Florianópolis.
- RIAD, N. H. A.; FARES, N. H.; MOSTAFA, O. M. S.; MAHMOUD, Y. I. 2007. The effect of garlic on some parasitological parameters and on hepatic tissue reactions in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Applied Sciences Research**. 3: 949-960.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. 2006. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**. 99: 505-521.
- RICHARDS, H. C. & FOSTER, R. 1969. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. **Nature**. 222: 581-582.
- ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; CLAPAROLS, C.; MEUNIER, B. 2005. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 102: 13676-13680.
- ROBINSON, C. H.; BUEDING, E.; FISHER, J. 1970. Relationship between structure, conformation and antischistosomal activity of nitroheterocyclic compounds. **Molecular Pharmacology**. 6: 604-616.
- RODRÍGUES, E. & WEST, J. E. 1995. International research on biomedicines from the neotropical rain forest. **Interciência**. 20: 140-143.
- ROLDÃO, E.; WITACENIS, A.; SEITO, L. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Di STASI, L. C. 2008. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 119: 94–98.

- ROLLAS, S. & KUÇUKGUZEL, S. G. 2007. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**. 12: 1910-1939
- ROSI, D.; PERUZZOTI, G.; DENNIS, E. W.; BERBERIAN, D. A.; FREELE, H.; ACHER, S. 1965. A new active metabolite of Miracil D. **Nature**. 208: 1005-1006.
- SABAH, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M. J. 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Experimental Parasitology**. 61: 294-303.
- SALAZAR-MALLEN, M.; GONZALEZ-BARRANCO, D.; MITRANI-LEVY, D. 1969. Trichlorophone in onchocerciasis. **The Lancet**. 1: 426.
- SANDERSON, L.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P. J. 2002. *In vitro* and *in vivo* studies of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**. 76: 241-247.
- SANGSTER, N. C.; SONG, J.; DEMELER, J. 2005. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**. 131: S179-S190.
- SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 17: 1027-1030.
- SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. 2008. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**. 14: 407-412.
- SCHUBERT, M. 1948; Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis *mansoni* in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 28 :121-136.
- SERTIÉ, J. A. A. 1988. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of leaves. **Planta Médica**. 7-11.

- SERTIÉ, J. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. 1990. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity artemetin. **Planta Medica**. 56: 36-40.
- SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. 2005. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**. 12: 338-344.
- SES (Secretaria de Estado da Saúde) & SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias). 1982. Relatório da Situação da Esquistossomose no Estado de São Paulo. **II Encontro sobre Esquistossomose**. São Paulo: São Paulo.
- SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; QINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y.; SIWEN, L.; LIYONG, W.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. 2006. Evaluation of the antihelminthic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitology International**. 55: 63-68.
- SHAW, M. K. & ERASMUS, D. A. 1983. *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental changes after *in vivo* treatment with praziquantel. **Parasitology Research**. 69:643-653. 1983.
- SHAW, M. K. & ERASMUS, D. A. 1988. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. **Experimental Parasitology**. 65: 31-42. 1988.
- SHEIR, Z.; NASR, A. A.; MASSOUD, A.; SALAMA, O.; BADRA, G. A.; EL-SHENNAWY, H.; HASSAN, N.; HAMMAD, S. M. 2001. A safe, effective, herbal antischistosomal therapy derived Schistosomiasis from myrrh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 65: 700-704.
- SHUHUA, X. BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; TANNER, M. 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. **The Journal of Parasitology**. 86: 1125-1132.

- SHUHUA, X.. 2005. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Tropica**. 96: 153-167.
- SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. 2005. Schistosomiasis mansoni - clinical features. **Gastroenterología y Hepatología**. 28: 30-39.
- SMITHERS, S. R. & DOENHOFF, M. J. 1976. Schistosomiasis. *In*: COHEN, S. & WARREN, K. S. (editores). **Immunology of Parasitic Infections 2ª ed.** Blackwell Scientific Publications: Oxford.
- SOUZA, C. P.; ARAÚJO, N.; CARVALHO, O. S.; FREITAS, J. R. 1987. Potencialidade de *Biomphalaria tenagophila* do Lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG, como hospedeira do *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 82: 67-70.
- SOUZA, M. F.; NERY, P. S.; MANGANOTTI, S. A.; MATOS, C. C.; MARTINS, E. R. 2009. Conteúdo de óleo essencial de *Cordia verbenacea* em diferentes horários de coleta. **Resumos do VI CBA e II CLAA - Revista Brasileira de Agroecologia**. 4: 2672-2675.
- SOYEZ, H.; SCHACHT, E.; VANDERKERDEN, S. 1996. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 21: 81-106.
- SPERA, L. J. 2005. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de microesferas de etilcelulose contendo praziquantel para serem veiculadas em suspensão para administração oral**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP.
- STADECKER, M. J. 1992. The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. **Parasitology Today**. 8: 199-204.
- STANDEN, O. D. 1963. Chemotherapy of helminthic infections. *In*: SCHNITZER, R.. J. & HAWKING, E. **Experimental Chemotherapy**. Academic Press: Londres.

- STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**. 6: 411-425.
- STELMA, F. F.; TALLA, I.; SOW, S.; KONGS, A.; NIANG, M.; POLMAN, K.; DEELDER, A. M.; GRYSEELS, B. 1995. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 53: 167-170.
- STOHLER, H. R. (1978). Ro 11-3128 – a novel schistosomicidal compound. *In*: SIEGENTHALER, W. & LIITHY, R. (editores), **Current Chemotherapy**, 147-148, American Society for Microbiology: United States.
- STOHLER, H. R. & MONTANOVA, M. 1984. 9-Acridanonehydrazones, a novel class of broad-spectrum schistosomicidal agents, **Proceedings of International Congress of Tropical Medicine and Malaria**, 16-22, Calgary: Canada.
- STRIEBEL, H. 1976. 4-Isothiocyanato-4'-nitrodiphenylamine (C 9333-GoiCGP 4540), an anthelmintic with an unusual spectrum of activity against intestinal nematodes, filariae and schistosomes. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 32: 457-458.
- SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias. Esquistossomose Mansônica. 2004. 01.11.2011. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>.
- TALLIMA, H. & RIDI, R. E. 2007. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. 2007. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 29: 570-575.
- TANNER, M. 1989. Evaluation of public health impact of schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 40: 143-148.
- TENDLER, M. & SIMPSON, A. J. G. 2008. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**. 108: 263-266.

THOMAS, H.; GÖNNERT, R.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. 1975. A new compound against adult tapeworms. **Proceedings of the 7th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**, p. 50, Thessaloniki: Greece.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I.; CAMABRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R.; STABELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology**. 46: 318–327.

TOMOSKY, T. K.; BENNETT, J. L.; BUEDING, E. 1974. Tryptaminergic and dopaminergic responses of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 190: 260-271.

THOMPSON, P. E.; MEISENHELDER, J. E.; NAJARIAN, H. 1962. Laboratory studies on the joint effects of tris (*p*-aminophenyl)-carbonium salts, tris (*p*-aminophenyl) methanol, and Lucanthone hydrochloride against *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 11: 31-45. 1962.

TONKAL, A. M. & MORSY, T. A. 2008. An update review on *Commiphora molmol* and related species. **Journal of the Egiptian Society of Parasitology**. 38: 763-796.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; OSSEY, Y. A.; BOOTH, M.; TRAORÉ, M.; LOHOURIGNON, K. L.; ALLANGBA, A.; AHIBA, L. A.; TANNER, M.; LENGELER, C. 2000a. Rapid screening for *Schistosoma mansoni* in wester Côte d'Ivoire using a simple school questionnaire. **Bulletin of the World Health Organization**. 78: 389-398.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; TANNER, M.; LENGELER, C. 2000b. Simple anamnestic questions and recalled water-contact patterns for self-diagnosis of

Schistosoma mansoni infection among schoolchildren in western Côte d'Ivoire. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 62: 649-655.

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

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

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. 2003. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 1487-1495.

UTZINGER, J. & KEISER, J. 2004. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 5: 263-285.

UTZINGER, J.; RASO, G.; BROOKER, S.; de SAVIGNY, D.; TANNER, M.; ORNBJERG, N.; SINGER, B. H.; N'GORAN, E. K. 2009. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**. 136: 1859-1874.

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

VAN-NASSAUW, L.; TOOVEY, S.; VAN-OP-DEN-BOSH, J.; TIMMERMANS, J. P.; VERCRUYSSSE, J. 2008. Schistosomicidal activity of the antimalarial drug, mefloquine, in *Schistosoma manconi* - infected mice. **Travel Medicine and Infectious Disease**. 36: 253-258.

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. 2006. Os produtos naturais e a química moderna. **Química Nova**. 2: 326-337.

- WEB ATLAS OF MEDICAL PARASITOLOGY. 2011. ***Schistosoma species***. 17/11/2011. Disponível em: http://atlas.or.kr/atlas/alphabet_view.php?my_codeName=Schistosoma%20species.
- WEBBE, G. 1981. Schistosomiasis: some advances. **British Medical Journal**. 283: 1104-1106.
- WEBBE G. & JAMES, C. 1977. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. **Parasitology Research**. 52: 169-177.
- WEGNER, D. H. G. 1984. The profile of trematodicidal compound praziquantel. **Arzneimittelforschung**. 34: 1132-1136.
- WEISS, M. G. 2008. Stigma and the social burden of neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2: S237.
- WERBEL, L. M. 1970. Chemotherapy of schistosomiasis. **Topics in Medicinal Chemistry**. 3: 125-169.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1993. **The control of schistosomiasis – second report of the WHO expert committee - Technical Series no. 830** World Health Organization: Geneva.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. Schistosomiasis. **Bulletin of WHO**. 6 (suppl.2): 150-151.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial, *In*: **Policy perspectives on medicines n. 2**, 01.07.2011, Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/who_edm_2002.4_spa.pdf.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS. **Estrategia sobre medicamentos de la OMS 2000-2003**. 1: 1-6.

- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004. **World health report 2004: changing history**. Geneva: WHO.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010. Schistosomiasis, *In: Media Centre - Fact sheets*, 01.11.2011, Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. **The global atlas on schistosomiasis**. 01.11.2011. Disponível em: www.who.int/schistosomiasis/epidemiology.
- WILSON, M. S.; MENTINICK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology & Cell Biology**. 85: 148-154.
- WOOLHOUSE, M. E. J. 1998. Patterns in parasite epidemiology: the peak shift. **Parasitology Today**. 14: 428-434.
- XAVIER, E. M.; LUCENA-SILVA, N.; WERKHAUSER, R. P.; FRANCO, G. R.; SANTOS, R. A. A. L.; SIMPSON, A. J. G.; ABATH, F. G. C. 1998. The tegument of *Schistosoma mansoni*: genes, antigens and the host-parasite relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 93: 85-86.
- XIAO, S. H.; YU, Y. G.; WANG, C. Y.; JIAO, P. Y.; YUAN, X. J.; LIANG, Y. 1981. The uptake and distribution of [³H]-pyquitolon in *Schistosoma japonicum*. **Chung Kuo Yao Li Hsuch Pao**. 16: 488-493.
- XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. 1985. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **Journal of Infectious Diseases**. 151: 1130-1137.
- XIAO, S. H.; YOU, J. Q.; GUO, H. F.; JIAO, P. Y.; MEI, J. Y.; YAO, M. Y.; FENG, Z. 1998. Effect of artemether on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglyceratekinase, and pyruvate kinase of *Schistosoma japonicum* harbored in mice. **Acta Pharmacologica Sínica**. 19: 279-281.

- XIAO, S. H. & CATTO, B. A.; 1989. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 33: 1557-1562
- XIAO, S. H.; YOU, J. Q.; GUO, H. F.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y.; YAO, M. Y.; ZHUANG, Z. N.; FENG, Z. 1999. Effect of artemether on phosphorylase lactate dehydrogenase, adenosine triphosphatase and glucosephosphate dehydrogenase of *Schistosoma japonicum* harbored in mice. **Acta Pharmacologica Sínica**. 20: 750-754.
- XIAO, S. H.; HOTEZ, P. J.; TANNER, M. 2000. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its *in vivo* effect on the biochemical metabolism of the asian schistosome. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 31: 724-732.
- XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VANNERSTROM, J. L.; TANNER, M. 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51: 1440–1445.
- YAZDANBAKHSI, M.; DEELDER, A. M. 1998 Advances in schistosomiasis research. **Current Opinion of Infectious Disease**. 11: 542-546.
- YOLLES, T. K.; MOORE, P.V.; DE GINSTE, D.L.; RIPSON, C.A.; MELENEY, H.E. 1947. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **Journal of Parasitology**. 33: 419-26.
- YOSHIOKA, L.; MAGALHÃES, E. M. Z.; MAGAÇHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. 2002. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia Santa Rosa (Campinas-SP-Brasil) em camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35: 203-207.
- YUE, W. J.; YOU, J. Q.; MEI, J. Y. 1984. Effects of artemether on *Schistosoma japonicum* adult worms and ova. **Acta Pharmacologica Sinica**. 5: 60-63.

YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. 2001. **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos: Chapecó.