



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**EFEITOS SINÉRGICOS DE COMBINAÇÕES *IN VITRO* DE
PIPLARTINA, EPIISOPILOTURINA E PRAZIQUANTEL CONTRA
Schistosoma mansoni.**

YURI DIAS MACEDO CAMPELO

Teresina-PI
2017

Yuri Dias Macedo Campelo

**EFEITOS SINÉRGICOS DE COMBINAÇÕES *IN VITRO* DE
PIPLARTINA, EPIISOPILOTURINA E PRAZIQUANTEL CONTRA
*Schistosoma mansoni***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. (Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais).

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Co-orientador: Josué de Moraes.

Teresina – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
SETORIAL PROF. CÂNDIDO ATHAYDE – CAMPUS PARNAÍBA

C193e Campelo, Yuri Dias Macedo.

Efeitos sinérgicos de combinações in vitro de pipartina, episopiloturina e praziquantel contra *Schistosoma mansoni*. / Yuri Dias Macedo Campelo. – Teresina: 2017.

158f.

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia/RENORBIO - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto de S. de Almeida Leite

1. Biotecnologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Combinação de Fármacos
4. Análogos de Pipartina, 5. Citotoxicidade. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: YURI DIAS MACEDO CAMPELO

TÍTULO DO PROJETO: "EFEITOS SINÉRGICOS DE COMBINAÇÕES IN VITRO DE
PIPLARTINA, EPIISOPLOTURINA E PRAZIQUANTEL CONTRA Schistosoma mansoni "

PROFESSOR ORIENTADOR: José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite - UFPI (Presidente)	SATISFATORIO	
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	SATISFATORIO	
Prof. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros – UFPI (Examinador)	SATISFATORIO	
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus - UFBA (Examinador)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 19 de Dezembro de 2017.

HORÁRIO: 14:30h

LOCAL: Na sala de reuniões do Campus Ministro Reis Veloso - Parnaíba.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da Vida e da Sabedoria. Aos meus pais Paulo Campelo e Maria do Amparo Campelo por me apoiarem sempre e acreditarem nas minhas decisões, que não mediram esforços para me proporcionar a melhor educação, pela sua coragem, por sua força, pelas orações da minha mãe sempre constante na minha vida e pelo amor incondicional. As minhas irmãs Lidianne Campelo e Maria de Fátima Campelo pelo amor e o carinho, pelo o apoio e o incentivo sempre.

A Vanessa Meneses de Brito obrigado por estar comigo desde o começo, pelo carinho, pela compreensão, obrigado por dividir os momentos difíceis ao longo desta jornada.

Ao meu Orientador professor Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite pelo incentivo, a confiança, o entusiasmo e sua grande amizade. Obrigado por tudo que me ensinaste ao longo desses 9 anos, além de orientador um grande amigo e uma grande pessoa, grande pesquisador, obrigado por cada palavra e apoio sempre.

A professora Dra. Carla Eiras, uma pessoa importante neste processo, pois toda essa conquista, começou através dela nos primeiros trabalhos que iniciamos, o que fez despertar em mim a pesquisa.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, e a todos que fazem parte do Núcleo, em especial Leiz Veras, Jessica Telles, Adriany Amorim, Joilson Ramos, Maria Adelaide Guimarães, Stéfano Campos, Patrick Quelemes e Raimunda Nascimento pelo apoio, ajuda e torcida muito obrigado mesmo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, RENORBIO, obrigado pela oportunidade e o aprendizado ao longo deste período.

Aos meus colegas de classe obrigado pela convivência, as noites de sono perdida em busca de ideal comum a todos.

Aos que fazem parte do Laboratório de Parasitologia, do Instituto Butantã em nome do Professor Ronaldo Medonça e do Instituto Adolfo Lutz em nome do Professor Pedro Luiz e a Josue de Moraes e Marcos, que fazem parte do Núcleo de doenças negligenciadas obrigado pela parceria e por ajudarem nos experimentos que fazem parte deste trabalho.

Ao Instituto de Física, da USP, em São Carlos, no nome da Professora Yvone Mascarenhas e a Ana Carolina Mafud.

Ao Instituto de Química, da USP, São Paulo Ao professor Massuo Kato e Lydia Yamaguchi pela parceria.

A empresa de Extração Anidro do Brasil S.A, em especial ao David Lima e Luciene Vasconcelos e a PHYTOBIOS pela parceria e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, pelo apoio técnico essencial para os resultados deste trabalho, em especial professora Graziella Anselmo Joanitti e Alicia, por ter acreditado e aceitado em participar do desafio da realização desse trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal Periódicos e pela concessão da bolsa.

À FAPEPI (Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí), pela concessão da bolsa.

Ao CNPq (Conselho Nacional e Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Ao RENORBIO/ Ponto focal Universidade Federal do Piauí, pelo subsídio à realização deste trabalho e aos professores que fazem parte do programa pelos conhecimentos compartilhados.

À minha família e a Deus, pelo apoio e amor incondicionais.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito , que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cizenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	12
LISTA DE TABELA	13
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 - INTRODUÇÃO	20
2.OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVOS GERAIS	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO I	24
1 – REFERENCIAL TEÓRICO	25
1.1 – ESQUISTOSSOMOSE E <i>Schistosoma mansoni</i>	25
1.2 – CONTROLE E TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	31
1.3 - COMPOSTOS NATURAIS ANTIESQUISTOSSOMA.....	36
1.4 - DIVERSIDADE DA FLORA BRASILEIRA.....	40
1.5 – PIPERACEAE (<i>PIPER</i>).....	41
1.6 - JABORANDI.....	43
1.7 - ALCALÓIDES ORIUNDOS DO JABORANDI.....	45
1.8 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS.....	48
1.8.1 - ISOBOLOGRAMA.....	48
1.8.2 - ÍNDICE DE COMBINAÇÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO	
II	79
Resumo	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1 Análise de Similaridade Baseada em Ligantes Ativos.....	84
2.2 Avaliação da características de semelhança entre as moléculas.....	84
2.3 Moléculas.....	85
2.4 Animais e Parasitas.....	86
2.5 Schistosomas adultos.....	86
2.6 Ensaios de combinações de fármacos.....	86

2.7. Análise estatística.....	87
2.8. Estudos de microscopia.....	87
2.9. Avaliação citotóxica.....	88
3. RESULTADOS.....	89
3.1 Similaridade em pares	89
3.2 Avaliação de semelhança entre as moléculas	90
3.3 Isolamento e Caracterização	91
3.4 Ensaio de fármaco único contra <i>S. mansoni</i>	91
3.5 Efeito das combinações PPT-EPI contra <i>S. mansoni</i>	92
3.6 Efeito das combinações PPT-PZQ contra <i>S. mansoni</i>	94
3.7 Efeito das combinações EPI-PZQ contra <i>S. mansoni</i>	96
3.8. Avaliação de citotoxicidade.....	100
4. DISCUSSÃO	102
MATERIAL SUPLEMENTAR	105
REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO III.....	116
Resumo	120
1. INTRODUÇÃO	121
2. Materiais e Métodos	122
2.1. Piplartina e Sínteses dos análogos.....	122
2.2. Cálculos Teóricos	123
2.3. UV-VIS Spectro de absorção.....	123
2.4. Estudos físico-químicos e de toxicidade <i>in silico</i>	124
2.5. Ensaio de citotoxicidade.....	124
2.6. Avaliação esquistossomicida <i>in vitro</i>	125
2.6.1. Organismos utilizados e manutenção do ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	125
2.6.2. Recuperação dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	126
2.6.3. Experimentos <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	126
2.7. Aspectos Éticos.....	127
2.8. Análises gráficas e estatísticas	127
3. Resultados	128
3.1. Calculos Teóricos e UV-VIS Spectro de absorção.....	128
3.2. Estudos <i>in silico</i>	129
3.3. Ensaio de Citotoxicidade	132

3.4. Experimentos <i>in vitro</i> contra vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	138
4. Discussão	139
5. Conclusão	143
REFERÊNCIAS	153
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	157
APÊNDICE.....	158
ANEXOS	163

LISTA DE SIGLAS

BIOTEC – Núcleo de pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia

EPIIHCL – Cloreto de Epiisopiloturina

DMSO – Dimetilsufóxido

EPII - Epiisopiloturina

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IC – Índice de Combinação

I_{comb} – Índice de Combinação

Mg – Miligrama

ML – Mililitros

µL – Microlitro

µg – Micrograma

µM – Micromolar

He – Hélio

Da – Dalton

OMS – Organização Mundial da Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

WHO – World Health Organization

PPT – Piplartina

PZQ – Praziquantel

EPI - Epiisopiloturina

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO II

Tabela 1. Avaliação de Similaridade e Semelhança de Drogas.....90

Tabela 2. Efeito esquistossomicida da amida piplartina (PPT), do alcalóide epiisopiloturina (EPI) e do fármaco de referência praziquantel (PZQ) contra o *Schistosoma mansoni* após 72 horas.....91

Tabela 3. Efeito da piplartina (PPT) e da epiisopiloturina (EPI) em adultos *Schistosoma mansoni* de 49 dias de idade após 72 horas.93

Tabela 4. Efeito da piplartina (PPT) e praziquantel (PZQ) em *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade após 72 horas.....95

Tabela 5. Efeito da epiisopiloturina (EPI) e praziquantel (PZQ) em *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade após 72 horas.97

CAPITULO III

Tabela 1. Parâmetros básicos, geométricos, estruturais e de solubilidade de piplartina e seus análogos.....130

Tabela 2. Parâmetros básicos, geométricos, estruturais e de solubilidade de piplartina e seus análogos.....131

Tabela 3. Determinação de pD_2 e E_{max} para efeito citotóxico de piplartina e análogos em células de fibroblastos murinos (NIH-3T3).
.....132

Tabela 4. Efeitos *in vitro* de compostos contra *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade.....138

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Distribuição geográfica da esquistossomose. Distribuição da doença de acordo com seus agentes etiológicos.26

Figura 2. Ciclo de vida do *S. mansoni*.28

Figura 3. Morfologia dos ovos da espécie *Schistosoma mansoni* responsável por infectar o homem.....31

Figura 4. Estrutura Molecular do Praziquantel.....35

Figura 5. Estrutura molecular da amida piplartina43

Figura 6. Estrutura química da Pilocarpina.....48

CAPÍTULO II

Figura 1. Estruturas químicas dos compostos estudados, com centros quirais em rosa. A: Praziquantel, B: Piplartina e C: Epiisopiloturina85

Figura 2. Superposição entre os três compostos, relacionando o raio vdW 1, o potencial eletrostático 2 e o potencial combinatório vdW / eletrostático.....89

Figura 3. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com amida piplartina e alcalóide epiisopiloturina administrado individualmente e em combinações.....93

Figura 4. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com praziquantel e amida piplartina administrado individualmente e em combinações..96

Figura 5. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com praziquantel e alcalóide epiisopiloturina administrado individualmente e em combinações.....98

Figura 6. Imagem por SEM do tegumento dorsal de vermes machos de *S. mansoni*, todas as imagens mostram um sinal eletrônico secundário.....99

Figura 7. Isobogramas para efeito combinado de PPT e EPI (A), PPT e PZQ (B), EPI e PZQ (C) contra *Schistosoma mansoni*.. 100

Figura 8. Avaliação morfológica dos efeitos nas células VERO (8A a 8D), L929 (8E a 8H) e MDCK (8I a 8M) sob coloração violeta de cristal após 72 horas de incubação 101

CAPÍTULO III

Figura 1. Densidade eletrônica: a) piplartina, b) 19, c) 1g, d) 14b, e) 6b e f) 1m. As cores representam vermelho (negativo) e azul (positivo).....128

Figura 2. Espectros de absorção de luz ultravioleta e visível de piplartina e análogos. Comprimento de onda da absorbância máxima na faixa de 280-400.....127

Figura 3. Avaliação da citotoxicidade em células de fibroblastos murinos NIH3T3 após 24 horas de exposição a diferentes amostras.....131

Figura 4. Avaliação da citotoxicidade em células de macrófagos de murino (J774) após exposição durante 24 horas para piplartina e análogos (19A, 1G, 1M, 14B e 6B) em concentrações de 25, 100 e 400 µg / mL.133

Figura 5. Avaliação da citotoxicidade em células de macrófagos de murino (J774) após exposição durante 24 horas para piplartina e análogos (19A, 1G, 1M, 14B e 6B) em concentrações de 25, 100 e 400 µg / mL. O DMEM foi usado como controle negativo.....135

RESUMO

A esquistossomose é considerada um problema de saúde pública no mundo. Atualmente o praziquantel é a única droga utilizada no tratamento desta patologia e este medicamento vem apresentando resistência devido ao seu uso extensivo. Combinação entre drogas é uma estratégia importante para o tratamento de várias infecções, aumentando a eficácia, diminuindo a resistência e a toxicidade. Este estudo avaliou a atividade *in vitro* da interação entre o alcaloide epiisopiloturina, a amida piplartina e a droga de referência praziquantel e análogos sintéticos a partir da piplartina contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* com 49 dias de idade. O capítulo I apresenta uma breve revisão sobre a esquistossomose, produtos naturais, alcaloides, amidas, produtos naturais estes principalmente epiisopiloturina e a piplartina e o uso combinado de produtos naturais como alternativa no tratamento de doenças negligenciadas. No capítulo II, foi verificado o efeitos *in vitro* da combinação entre piplartina, praziquante e epiisopiloturina contra vermes adultos de *S.mansoni*. Foram calculados os valores de LC₅₀ e LC₁₀₀ para o alcaloide epiisopiloturina, amida piplartina e praziquantel contra o parasita *S. mansoni*. Combinações entre epiisopiloturina/praziquantel; piplartina/praziquantel; epiisopiloturina/piplartina mostraram atividade sinérgica e de adição contra vermes adultos do parasita *Schistosoma mansoni* com índice de combinação (IC) a partir de 0,42. Foram observadas alterações tegumentares com estas combinações com a utilização do microscópio confocal a laser e SEM. O sinergismo entre estes farmoquímicos e o praziquantel na atividade *in vitro* contra o parasita *S.mansoni* apresentou melhor resultado do que utilizadas isoladamente. A interação entre epiisopiloturina/piplartina diminuiu a toxicidade em células de mamíferos do tipo VERO, MDCK e L929. No capítulo III, foi estudado a atividade *in vitro* esquistossomicida e a citotoxicidade da piplartina e seus análogos. Os análogos foram sintetizados a partir da piplartina, foi verificado que a piplartina apresentou atividade contra o parasita *S.mansoni*, mas os análogos não apresentaram atividade nas concentrações testadas, quanto a citotoxicidade, os análogos quando comparado a piplartina não apresentou toxicidade para células de mamíferos nas concentrações de até 200 µg/ml. Estes são os primeiros estudos de sinergismo entre epiisopiloturina, piplartina e praziquantel contra *S. mansoni*, com isto estudos *in vivo*

são necessários para verificar o mecanismo de ação da atividade esquistossomicida resultante destas interações, como também demonstrou que os análogos da piplartina, quando comparado a esta molécula, apresentou perda da atividade contra o parasita *S.mansoni*, mas conseqüentemente os análogos apresentaram diminuição da toxicidade quando comparada a piplartina.

Palavra chave: *Schistosoma mansoni*, combinação de fármacos, análogos de piplartina, citotoxicidade.

ABSTRACT

Schistosomiasis is considered a public health problem in the world. Currently praziquantel is the only drug used in the treatment of this pathology and this drug has shown resistance due to its extensive use. Combining drugs is an important strategy for treating multiple infections, increasing efficacy, decreasing endurance and toxicity. This study evaluated the *in vitro* activity of the interaction between the alkaloid epiisopyloturine, amide piplartine and the reference drug praziquantel and synthetic analogs from piplartine against 49-day-old *Schistosoma mansoni* adult worms. Chapter I presents a brief review on schistosomiasis, natural products, alkaloids, amides, natural products, mainly epiisopiloturine and piplartine and the combined use of natural products as an alternative in the treatment of neglected diseases. In chapter II, the *in vitro* effects of the combination of piplartin, praziquante and epiisopiloturin against *S. mansoni* adult worms were verified. LC50 and LC100 values were calculated for the alkaloid epiisoptylurine, amide piplartine and praziquantel against the *S. mansoni* parasite. Combinations of epiisopiloturine / praziquantel; piplartine / praziquantel; epiisopiloturine / piplartine showed synergistic and addition activity against adult worms of the *Schistosoma mansoni* parasite with combination index (CI) from 0.42. There were tegumentary changes with these combinations with the use of the laser confocal microscope. The synergism between these pharmacochemical and praziquantel in the *in vitro* activity against *S.mansoni* parasite presented better results than those used alone. The interaction between epiisopiloturine / piplartine decreased toxicity in mammalian cells of the VERO type MDCK and L929. In Chapter III, the *in vitro* schistosomicidal activity and the cytotoxicity of piplartine and its analogues were studied. The analogs were synthesized from piplartine, it was found that piplartine showed activity against the *S. mansoni* parasite, but the analogues showed no activity at the tested concentrations, as for cytotoxicity, the analogues when compared to piplartine did not present toxicity to mammalian cells at concentrations up to 200 µg/ ml. These are the first synergistic studies of epiisopiloturine, piplartine and praziquantel against *S. mansoni*, with which *in vivo* studies are required to verify the mechanism of action of the schistosomicidal activity resulting from these interactions, but also demonstrated that the piplartine

analogs, when compared to this molecule, showed a loss of activity against the *S.mansoni* parasite, but consequently the analogs showed decreased toxicity when compared to praziquantel.

Key-word: *Schistosoma mansoni*, combination, analogs, praziquantel, cytotoxicity.

1 – INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença de regiões tropicais e subtropicais causada pelo parasita do gênero *Schistosoma*, onde a espécie *Schistosoma mansoni* é a principal causadora desta patologia em humanos. Os sintomas da esquistossomose são quase todos devidos á produção de ovos, que estão presentes no fígado, baço e outros tecidos. A resposta inflamatória mediada pelo sistema imune a estes ovos é que causa maiores danos ao hospedeiro (GRYSEELS, 2006). A infecção por este helminto é maior em pessoas que vivem em comunidades que não apresentam saneamento básico adequado e acesso à água potável. O caramujo de água doce é o principal hospedeiro intermediário desta doença. (GEIGER, 2008).

Os medicamentos de escolha para a terapia da esquistossomose atualmente são o praziquantel (PZQ) e a oxamniquine. No entanto estudos têm relatado a resistência e ineficácia destas drogas. Devido a isto, é necessário o desenvolvimento de novos e mais eficazes compostos esquistossomicidas. O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta em relação a sua flora, o que faz desta uma fonte de produtos naturais para a pesquisa de diversos medicamentos e princípios ativos para utilização em diversas doenças seja ela bacteriana, parasitária, viral e fúngica (FOGLIO et al., 2006). Planta Medicinal é definida como um vegetal que apresenta em sua composição princípios ativos com alguma atividade biológica e que pode ser útil a saúde do homem ou aos animais (CORRÊA e ALVES, 2008). Com o pressuposto de que esses apresentam uma ação biológica eficaz com baixa toxicidade e efeitos colaterais (FÚZER et al., 2003), os mesmos podem ser utilizados na produção de fitoterápicos, que de acordo com a ANVISA são medicamentos, suplementos e chás oriundos dessas plantas.

No mundo e em particular nos países da América do Sul o uso de planta medicinal para cura de várias enfermidades é uma prática antiga e consiste nos primeiros cuidados com a saúde (MACIEL et al., 2002). As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais têm contribuindo para se conhecer e divulgar de forma relevante o poder terapêutico destes vegetais, prescritos e utilizados com frequência, pelos efeitos medicinais que estes produzem, apesar de

nem sempre terem sua caracterização química, atividade biológica e mecanismo de ação conhecido (FÜZER et al., 2003).

Com advento e o desenvolvimento da inovação tecnológica no Brasil, as pesquisas na área de plantas medicinais, a partir da prospecção da flora brasileira a cada dia ganham um avanço com o propósito de descobrir novos agentes terapêuticos para a utilização destes em várias patologias que acometem os seres humanos (BATALHA, 2007). Uma das principais vantagens apresentadas pelas plantas medicinais e fitoterápicas é o baixo custo. Outro grande diferencial destes fármacos para os sintéticos consiste em seus efeitos adversos, ou seja, menor incidência de efeitos colaterais. Isto tem estimulado aos centros de pesquisa estudar e descobrir novas formas terapêuticas no tratamento de várias doenças a partir do arsenal de produtos existentes na flora brasileira (GALLO et al., 2005).

Várias plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos, mas vários obstáculos foram encontrados neste processo, o qual se destaca a existência de compostos indesejáveis, com isto a indústria farmoquímica tem preferido isolar e caracterizar os produtos naturais de plantas que apresentam atividade biológica sobre outros organismos para posteriormente desenvolver o fármaco (SILVA, 2010).

Dentre as espécies encontradas na flora brasileira, de grande importância e de grande valor medicinal destacam-se as pertencentes à família Rutaceae e a Piperaceae. Um dos gêneros pertencente à família Rutaceae é o *Pilocarpus* que está presente em todo o continente americano, onde no Brasil é conhecida como jaborandi. Esta planta passou a ser estudada quando foi confirmada sua potente ação no sistema secretor, passando a ser utilizada como planta medicinal. Com o isolamento do alcalóide pilocarpina e a descoberta da sua atividade biológica para diminuição da pressão intraocular (glaucoma), esta planta passou a ser uma das mais importantes da flora brasileira (PINHEIRO, 1997 e SILVA, 2004).

O gênero *Piper* da família Piperaceae, apresenta vários metabólitos secundários utilizados como terapêuticos na medicina popular dentre os quais podemos citar a amida piperartina que apresenta atividade antioxidante, antitumoral e antibacteriana e vem sendo alvo de estudo por pesquisadores devido à importância medicinal e econômica desta planta (Kato et al., 2007; Prasad et al., 2005). A propriedade antiparasitária é motivo de inúmeros estudos devido à ausência de medicamentos e o aumento da resistência parasitária as drogas convencionais

sendo uma ameaça ao tratamento da doença (SALCEDO et al., 1997). Estudos têm demonstrado que o sinergismo entre compostos derivados a partir de plantas medicinais, bem como a interação destes compostos com drogas de uso convencional pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico, bem como não interferir na resposta esperada (NASCIMENTO et al., 2000)

A combinação entre compostos e drogas com atividade antimicrobiana e antiparasitária vem sendo pesquisado no Brasil e no mundo com o intuito de aumentar a atividade contra estas doenças e diminuir os efeitos colaterais provocados por estas drogas e tem mostrado resultados positivos na atividade *in vitro* (UTZINGER et al., 2003). O uso combinado entre drogas é uma alternativa utilizada na terapia de doenças, incluindo, o câncer, a malária e a tuberculose. Estudos da interação entre a amida piplartina e o peptídeo antimicrobiano Dermaseptina 01 apresentam atividade contra o parasita *Schistosoma mansoni* nas formas jovem e adulta (MORAES et al., 2012). Combinações entre praziquantel/mefloquina; praziquantel/artemisina; praziquantel/oxamniquine apresentam atividade *in vitro* contra o parasita *Schistosoma mansoni* (KEISER et al., 2011; UTZINGER et al., 2003).

A partir deste pressuposto este trabalho tem como o objetivo o estudo da interação entre o alcaloide epiisopiloturina, a amida piplartina, praziquantel e o efeito de análogos da piplartina na atividade *in vitro* contra o parasita *Schistosoma mansoni*, bem como a avaliação do efeito citotóxico em algumas linhagens de células de mamíferos provocadas pela interação entre estes farmoquímicos.

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo o estudo de análogos da piplartina e a interação entre os alcaloide epiisopiloturina e piplartina com a droga de referência praziquantel na atividade *in vitro* contra formas jovens e adultas de *Schistosoma mansoni* e a avaliação da citotoxicidade destes compostos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliação do sinergismo *in vitro* entre praziquantel e epiisopiloturina contra *S.mansoni* nas formas jovens e adultas

2.2.2. Avaliação do sinergismo *in vitro* entre praziquantel e piplartina contra o parasita *S.mansoni nas formas* jovens e adultas.

2.2.3. Avaliação do sinergismo *in vitro* entre epiisopiloturina e piplartina contra o parasita *S.mansoni nas formas* jovens e adultas.

2.2.4. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade células de mamíferos da associação entre os alcaloides imidazólicos do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), piplartina e a droga praziquantel.

2.2.5. Avaliação da atividade *in vitro* dos análogos da piplartina contra o parasita *S.mansoni*.

2.2.6. Avaliação da citotoxicidade sobre células de mamíferos dos análogos da piplartina.



CAPITULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – ESQUISTOSSOMOSE E *Schistosoma mansoni*

Dentre os parasitas presentes na terra por milhares de anos, ressaltam-se os helmintos, os protozoários e as enteroparasitoses que provocam danos à saúde do homem e dos animais (ALMEIDA e AYRES, 2006). A esquistossomose ou bilharziose é uma doença parasitária causada pelo helminto pertencente à classe trematoda do gênero *Schistosoma*, que acomete o homem e os animais (SHENAWY et al., 2008). A espécie *Schistosoma mansoni* é a responsável por causar esta patologia em humanos. Trata-se de uma doença negligenciada que inicialmente é assintomática podendo evoluir para uma forma mais grave levando a óbito. A magnitude desta parasitose está relacionada à sua prevalência e a severidade da evolução da forma clínica, o que caracteriza a esquistossomose de grande importância para a saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais (Geizer, 2008). São doenças que tem como principais agentes etiológicos as espécies: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (GRYSEELS et al., 2006). A figura 1 representa a distribuição geográfica da doença no mundo de acordo com o seu agente etiológico. A esquistossomose mansônica causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* é a utilizada em modelos quimioterápicos para descoberta de novas drogas por ser a que mais afeta o homem (VAN DER WERF et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006).

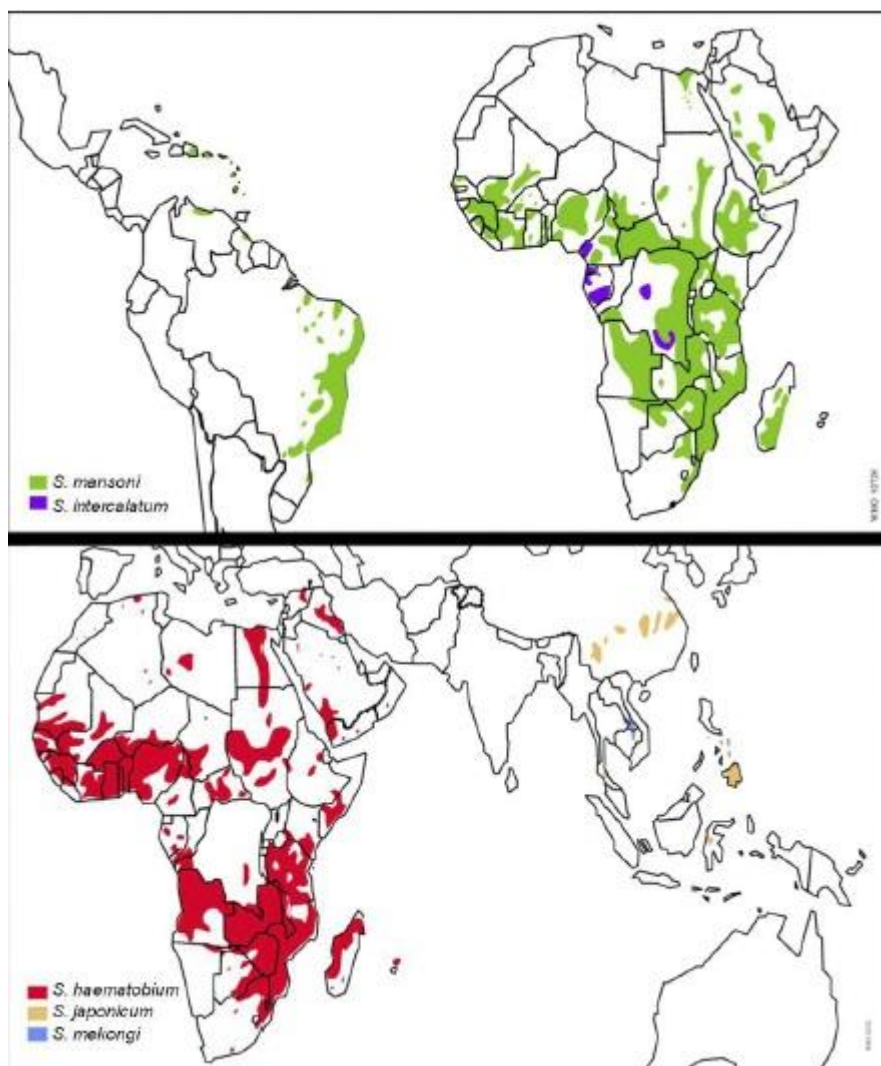


Figura 1. Distribuição geográfica da esquistossomose. Distribuição da doença de acordo com seus agentes etiológicos.

Fonte: WHO (2011)

A esquistossomose é uma grande causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo segundo pesquisa da Organização Mundial de Saúde (OMS). De acordo com o Ministério da Saúde a esquistossomose é caracterizada como uma doença de notificação compulsória, sendo notificada em áreas endêmicas e não endêmicas, mas em muitas regiões a mesma não é notificada o que dificulta ações preventivas no controle desta patologia (MORAES et al., 2012; Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil esta patologia é conhecida como Pirajá da Silva, sendo prevalente em 18 estados mais o Distrito Federal, sendo que sua prevalência e transmissão estão relacionadas à presença de moluscos em rios de água doce. No território

Nacional cerca de 6 milhões a 8 milhões de pessoas estão infectadas e 26 milhões estão em risco de se infectar por este parasita (AMARAL et al., 2006).

A esquistossomose mansoni é endêmica em 52 países da América do Sul, do Caribe, da África e da região Oriental do Mediterrâneo (KATZ E PEIXOTO, 2000). No mundo Cerca de 200 milhões de pessoas são infectadas pelo parasita *S.mansoni* e cerca de 800 milhões estão em risco de ser infectadas por este helminto. Esta helmintose é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente, perdendo apenas para a malária (BERGQUIST et al., 2008; STEINMANN et al., 2006; DUPRÉ et al., 1999;).

Esta doença é endêmica devido à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico onde ocorre a utilização de água contaminada no uso para a atividade doméstica, lazer e agricultura (KATZ E PEIXOTO,2000). No país, atualmente esta doença é detectada em todas as regiões. As principais áreas endêmicas e focais que acometem os seguintes estados: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (com predominância no norte e nordeste do estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (DRUMMOND et al.,2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GEIGER, 2008).

O parasita *Schistosoma* apresenta um ciclo biológico complexo (figura 2), apresentando hospedeiros intermediários e definitivos. Os vermes adultos são achatados dorsoventralmente, sem segmentação e simetria bilateral (GRYSEELS et al., 2006).

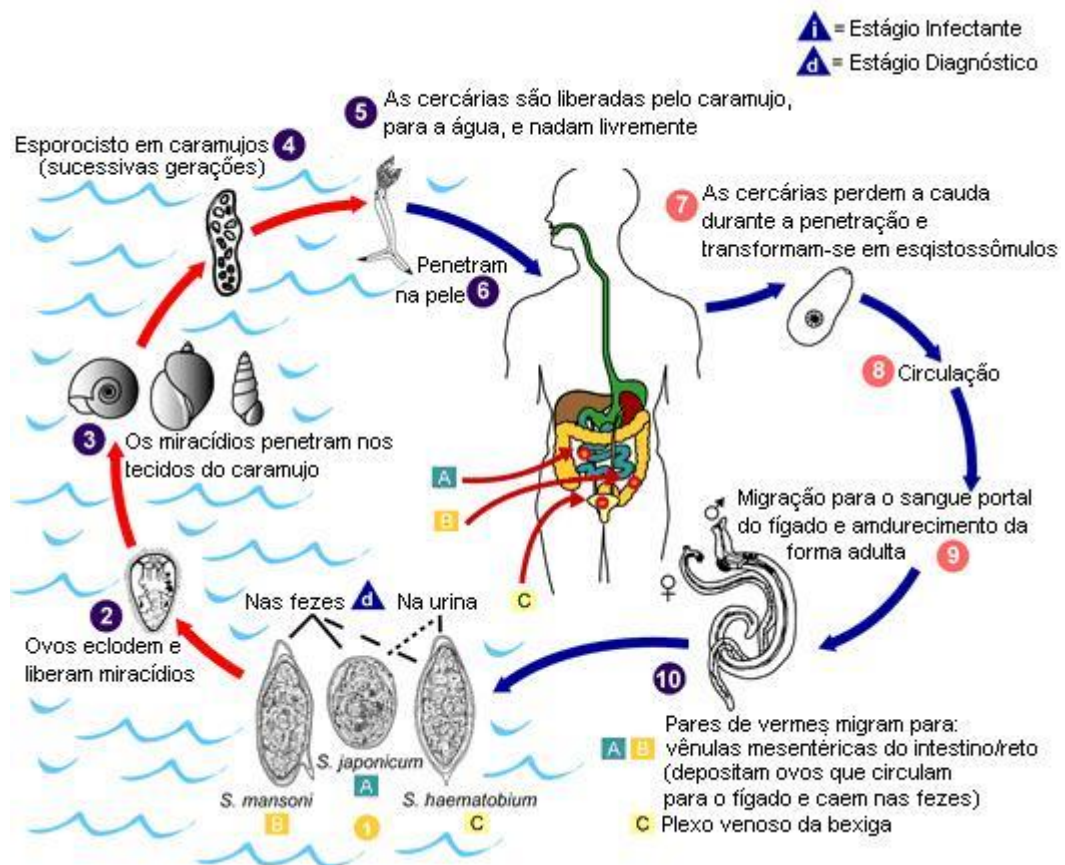


Figura 2. Ciclo de vida do *S. mansoni*.

Fonte: CVE (2005)

Os vermes fêmeas produzem vários ovos por dia, onde cada ovo contém uma larva miracídio ciliada que libera proteínas e enzimas proteolíticas que tem como função a migração destes ovos até o intestino (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004). Os ovos são excretados nas fezes e podem ser viáveis até 7 dias e ao entrar em contato com a água liberam o miracídio que irá procurar o hospedeiro intermediário. O caramujo de água doce, processo que acontece por estímulos químicos e luminosos. Depois de penetrar nos caramujos os miracídeos passam por reprodução assexuada transformando em esporocistos multicelulares e depois em larvas cercárias (GRYSEELS et al., 2006; ROSS et al., 2002).

Após 4 a 6 semanas as cercárias deixam os caramujos e contaminam rios de água doce, pouca correnteza e parada, permanecendo até 72 horas em busca do hospedeiro definitivo. (BLANCHARD, 2004). Os caramujos liberam centenas de cercárias ao longo de um dia durante o mês, a infecção no hospedeiro definitivo ocorre durante o dia devido à capacidade desta larva de desenvolver sua atividade neste período (GRYSEELS et al., 2006).

O Homem contrai a esquistossomose através da penetração ativa da cercaria na pele. Após a infecção as cercárias se desenvolvem em uma forma jovem denominada esquistossômulo, que inicia o processo de migração, via circulação sanguínea e linfática, até o coração e em seguida para os pulmões. Estas formas jovens chegam até os vasos sanguíneos, alcançando o fígado onde se desenvolvem na forma adulta. Nos vasos dos portais mesentéricos ocorre a sobreposição da fêmea no canal ginecóforo do macho e, conseqüentemente, a cópula que permitirá que ocorra a oviposição (GRYSEELS et al., 2006; BLANCHARD, 2004; ROSS et al., 2002).

Apresentam duas ventosas, uma anterior, onde se encontra a abertura bucal e a ventral ou acetábulo que consistem os órgãos de fixação e um sistema digestivo de fundo cego, sem a presença do ânus (MORAES et al., 2011; REY, 2010).

O *Schistosoma mansoni* adulto é um helminto longo e delgado, o macho mede cerca de 1 cm de comprimento, possui um sulco longitudinal ou canal ginecóforo e o tegumento é coberto por espinhos e tubérculos. A fêmea mede cerca de 1,5 cm de comprimento, é mais delgada e apresenta cor escura (acizentada), a topografia da superfície do corpo apresenta aspecto escavado, sendo bem mais simples do que a do macho. O verme é coberto por uma superfície conhecida como tegumento, região constituída de membranas apicais, que permite a interface de contato entre o parasita e o hospedeiro, cuja estrutura é formada por duas camadas lipídicas justapostas que constituem o membranocálix. Essas camadas têm um papel importante na capacidade de escape do helminto a resposta imune do hospedeiro (BUNDY, 2006; MORAES et al., 2011). O acasalamento tem um papel importante para a maturidade sexual, proteção da fêmea e produção de ovos, que são os responsáveis pelos sintomas e a severidade da doença (MACHADO e SILVA, 2008; MORAES et al., 2012).

Os principais transmissores da esquistossomose mansônica são caramujos gastrópodes, pertencente à família Planorbidae e o gênero *Biomphalaria* que permitem a reprodução assexuada do helminto e estão presentes em água doce. No continente americano três espécies de caramujos são responsáveis pela transmissão da esquistossomose: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (STEINMANN et al., 2006).

No Brasil a espécie *B. glabrata* é responsável pela transmissão da doença, a mesma é a mais estudada e pesquisada devido à localização e distribuição geográfica, onde esta espécie está presente em cerca de 24 estados, localizados na região Nordeste, Sudoeste e Centro-Oeste (MORGAN et al., 2001; PARAENSE, 2001).

É uma doença de evolução crônica, de gravidade variada, onde a evolução clínica da esquistossomose está relacionada a vários fatores como: susceptibilidade e imunidade do hospedeiro, relação entre parasita – hospedeiro, forma jovem e adulta e ovos; vale ressaltar que os ovos e as reações granulomatosas que os envolvem são os principais causadores da morbidade (SECOR, 2006).

A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção. Para a clínica médica a esquistossomose pode ser classificada em fase inicial e tardia. Assim esta doença está relacionada a vários fatores, como a presença local do agente etiológico (ovo, cercarias, vermes adultos), alterações hemodinâmicas no organismo e alterações imunológicas permitindo a infecção por outros agentes infecciosos (MORAES et al., 2011; WILSON et al., 2007).

Na forma mais grave há presença de hepatoesplenomegalia e fibrose periportal. Os principais fatores que estão relacionados com esta helmintose são produção de ovos, a carga parasitária influenciando na resposta imunológica, produção de anticorpos, a susceptibilidade e imunidade de cada indivíduo (MORAES et al., 2011; WILSON et al., 2007; GRYSEELS et al., 2006; YOSRY, 2006; SECOR, 2006; BLANCHARD, 2004; WYNN et al., 2004.).

Em relação ao diagnóstico desta patologia o exame microscópico de fezes continua sendo o método padrão ouro para a detecção da esquistossomose (ROSS et al., 2002). O teste de Kato-Katz é utilizado, pois o mesmo permite avaliar a infecção através das contagens dos ovos (figura 4). Outro meio de diagnóstico são os testes imunológicos, só que os mesmos não permitem a identificação da doença de maneira correta e em alguns casos pode ocorrer reação cruzada com outros helmintos (ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006; CLERINX et al., 2010).

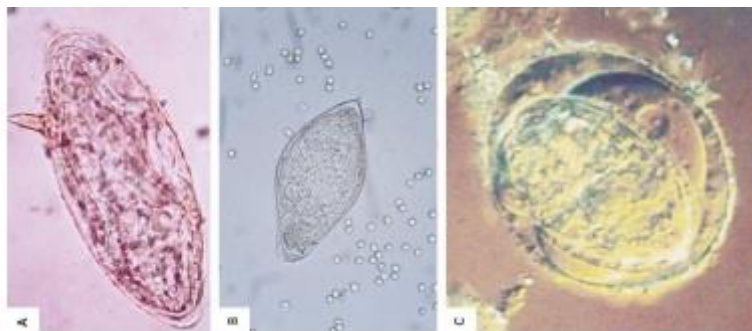


Figura 3. Morfologia dos ovos da espécie *Schistosoma mansoni* responsável por infectar o homem.

Fonte: ROSS, 2002.

A técnica de Kato-Katz desenvolvida no ano de 1950 pelos pesquisadores Kato e Miúra (Kato e Miúra, 1954) foi modificada no início de 1970 por Katz e colaboradores. No Brasil é a técnica mais utilizada para pesquisa e levantamento epidemiológicos da esquistossomose intestinal pelos grandes centros de pesquisa. Vários estudos têm sido feitos para investigar a precisão do exame para a quantidade de produção de ovos nas fezes, bem como a discussão da implicação deste para investigação no controle da esquistossomose (UTZINGER et al., 2010; BLANCHARD, 2004).

1.2 – CONTROLE E TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.

Programas de saúde pública vêm sendo desenvolvidos e aplicados com o intuito de controlar a esquistossomose nas regiões endêmicas, que consiste um desafio para os gestores em saúde. Os principais programas de saneamento básico, distribuição de água tratada, destino correto dos esgotos sanitários são as principais estratégias, que conciliadas com a educação em saúde e sanitária permite o controle da doença ao longo e médio prazo, estratégias estas que não são observadas nas áreas endêmicas (FENWICK et al., 2006; BERGQUIST, 2002).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são os principais responsáveis pela transmissão da esquistossomose, com isso o combate do hospedeiro intermediário é importante para o controle da doença. Os caramujos apresentam uma alta capacidade de reprodução e se desenvolvem facilmente em diferentes ambientes,

estes fatores é uma problemática para o seu controle. Vários métodos são utilizados para o controle dos moluscos, destes cita-se: ambientais, como canalização, assoreamento, limpeza de margens, presença de predadores, como peixe e aves, além de microorganismos que podem esterilizar caramujos e a utilização de componentes químicos que tem atividade moluscidas. Estes métodos provocam danos ao meio ambiente, com isso dificultando sua utilização na prática nas regiões endêmicas (TELES e CARVALHO, 2008).

A associação da luta antivetorial e a quimioterapia são a forma mais eficaz de controle da esquistossomose. Entretanto o tratamento desta parasitose apresenta uma grande limitação, que consiste na dificuldade de encontrar medicamentos com uma alta eficácia e que não apresente vulnerabilidade a esta patologia (HOTZ et al., 2010; MORAES et al., 2011).

Em 1918, os antimoniais começaram a ser utilizados na clínica para o tratamento de doenças parasitárias inclusive a esquistossomose. O antimonial de tártaro de potássio era utilizado para tratar a leishmaniose, mas observou-se que este composto tinha efeito na hematúria, sintoma causado pelo parasita *S.hematobium*. Devido aos efeitos colaterais provocados por este medicamento o seu uso foi interrompido e passou a ser administrado somente em pacientes hospitalizados (CIOLI et al., 1995).

Várias pesquisas para a busca de antimônios com atividade contra a esquistossomose foram feitas e alguns sais de antimônios começaram a ser utilizados no tratamento da esquistossomose, os quais podemos citar: antimônio de sódio, antimônio de lítio, gluconato de sódio (Triostam) (CIOLI et al., 1998). Estes compostos utilizados por cerca de cinquenta anos no tratamento da esquistossomose eram administrados por via intramuscular ou intravenosa e deixaram de ser usados na clínica devido a sua toxicidade, alterações nas células sanguíneas e em casos causarem morte súbita (MORAES et al., 2011; CIOLI et al., 1998).

O primeiro esquistossomicida conhecido usado por via oral foi o cloridrato de 1-N-dietil-amino-4-metil-9-tioxantona, lucantona (miracil D). Na década de 1960 houve um avanço e melhora no tratamento da esquistossomose com a descoberta de alguns compostos como hicantona, do niridazol, dos nitrofuranos e do metrifonato (CIOLI et al., 1995). A hicantona surgiu a partir da hidrometilação da lucantona, um

composto ativo por via oral, com eficácia, especificamente para as espécies de *S.mansoni* e *S. hematobium*. Com um certo tempo de uso, a hancantona (Etrenol) deixou de ser utilizada devido a sua tolerância, efeitos tóxicos e graves, causando óbito, inclusive no Brasil por causar lesões hepáticas agudas, não havendo uso de medicamentos para a terapêutica da esquistossomose (Andrade et al., 1974). Em 1971, Rogers e Bueding demonstraram que a espécie *S.mansoni* apresentou resistência para a hancantona. No Brasil esta mesma problemática foi relatada por Katz e colaboradores (1973) pela primeira vez, resistência a hancantona (CIOLI, 1995; GRYSSEEL et al., 2001).

No ano de 1964, o niridazol (Ambilhar) era utilizado no tratamento da esquistossomose via oral, com eficácia para as espécies *S. hematobium* e *S.japonicum* e *S.mansoni*. Estudos clínicos mostravam que este composto apresentava resultados positivos melhor em crianças do que em adultos. O principal mecanismo de ação deste era a sua atividade oxidativa contra o parasita, esta ação era responsável pelos efeitos colaterais como mutagenicidade, lesões renais, carcinogenicidade e imunossupressão produzidos no hospedeiro, devido a estes fatores o mesmo deixou de ser utilizado na terapêutica desta helmintose (CIOLI et al., 1995).

No mesmo ano, dois outros compostos antimoniais surgiram para serem utilizados no tratamento desta patologia: o nitrofuranos e o metrifonato (MORAES et al., 2012). Os nitrofuranos composto, de grande importância para a microbiologia, foram estudados por pesquisadores para verificar se este apresentavam atividade esquistossomicida, testes em camundongos mostraram que esta substância apresentava atividade contra a espécie *S.japonicum* e começou a ser utilizada na China, mas devido à toxicidade e atividade biológica abaixo do ideal os nitrofuranos deixaram de ser utilizados (CIOLI et al., 1998).

O metrifonato, um organofosforado com o nome comercial de Dipterex ou Dylox, apresentou atividade contra o *Ascaris lumbricoides in vitro* na década de 1960, passou a ser alvo de estudo para a terapêutica da esquistossomose. Em 1953, Bueding e colaboradores demonstraram pela primeira vez a presença de acetilcolinesterase em espécies de *Schistosoma* (ARCHER, 1995). O metrifonato um inibidor de acetilcolinesterase produzia uma paralisia flácida neste helminto, *in vitro*, que era facilmente revertida com a retirada da droga. Este composto é utilizado até

os dias de hoje, mas o seu uso foi limitado para caso de esquistossomose urinária (CIOLI et al., 1995; ARCHER, 1995).

Na década de 1970, os estudos e pesquisas para a descoberta de compostos com atividade esquistossomicida continuaram. Com isso um análogo estrutural ativo da lucantona, chamado de Mirozan, apresentou ótima atividade em camundongos no tratamento desta parasitose, mas o seu desenvolvimento não ocorreu devido à ausência desta atividade em macacos.

A indústria Pfizer, localizada na Inglaterra, continuou a estudar o Mirozan através de um projeto para a descoberta de compostos com atividade esquistossomicida. Foi feita a modificação química desta molécula várias vezes o que permitiu a descoberta de uma molécula ativa que foi denominada inicialmente de UK-3883, este metabólito apresentou excelente atividade contra esta helmintose, com o intuito de melhorar a sua resposta biológica, o mesmo foi modificado quimicamente novamente, recebendo o nome de UK-4271 e posteriormente de oxamniquina (CIOLI et al., 1995; BERGQUIST et al., 2008).

A Oxamniquina (6-hidroximetil-2-isopropil-aminometil-7-nitro-1,2,3,4-tetra-hidroquinolina foi descrita pela primeira vez no ano de 1960 (UTZINGER et al., 2003). Testes em camundongos mostraram que oxamniquina apresentou uma excelente atividade contra *S.mansoni* e não apresentou contra *S.japonicum* e *S. hematobium*, apresentando melhor resultado contra os vermes machos do que as fêmeas. A oxamniquina é o medicamento mais barato utilizado no tratamento do *S.mansoni* (CIOLI et al., 1995). Esta droga é administrada em uma única dose (15 a 20 mg/Kg) por via oral, em alguns casos mais graves da doença é administrada até 60 mg/Kg durante dois a três dias para que se obtenha a eficácia terapêutica desejada (UTZINGER et al., 2003).

Atualmente o medicamento de uso para o tratamento da esquistossomose é o praziquantel (figura 5), devido a vários fatores: melhor contra todas as espécies de *Schistosoma* e cestoides, falta de efeitos secundários graves e a administração por uma única dose via oral e intramuscular. A estrutura molecular pirozina-isonoquilona inicialmente foi explorada pela indústria Merck para testes para avaliar a sua atividade tranquilizante, depois esta estrutura passou a ser estudada pela empresa Bayer que desenvolvia medicamentos para helmintos, com isso foram feitas síntese e testes de mais 400 compostos com atividade anti-helmíntica, e a melhor molécula

que apresentou este resultado foi o praziquantel (CIOLI et al., 1998; VERAS et al., 2012).

O mecanismo de ação do praziquantel está relacionado à alteração dos canais Ca^{2+} dos esquistossomos aumentando a permeabilidade da membrana do helminto, a certos cátions monovalentes e divalentes, inclusive do cálcio, fazendo com que ocorra a intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. As três principais ações deste medicamento nos vermes são: contração muscular, lesão do tegumento e alterações metabólicas. A dose deste medicamento varia de 40 mg/Kg a 60 mg/Kg dependendo da espécie de *Schistosoma*. É eficaz na morbidade, mas o uso deste medicamento apresentou resultados menor do que o esperado (UTZINGER, 2003; GEIZER et al.,2008).

Estudos mostram que o Praziquantel não tem atividade contra as formas jovens do parasita e relatos de experiência afirmam que este medicamento apresenta resistência (CIOLI et al., 1998; UTZINGER, 2003; GRYSEEL et al., 2006; PICA-MATOCCIA, 2003, MORAES et al., 2011; WHO,2002). Outra problemática encontrada por este medicamento é que a dose utilizada de praziquantel para a terapêutica da esquistossomose, dificulta a passagem do comprimido pela via oral em crianças devido ao tamanho do comprimido.

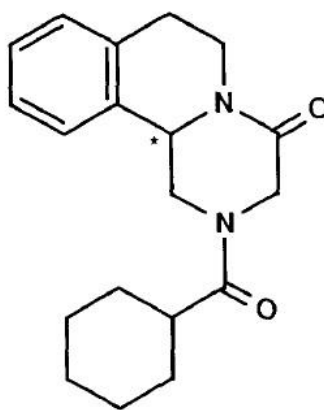


Figura 4.Estrutura Molecular do Praziquantel

Para controlar a esquistossomose pessoas que residem em áreas endêmicas devem fazer o tratamento de maneira correta, bem como ter acesso ao saneamento básico, evitar banhar em rios para que não entrem em contato com o hospedeiro

intermediário. Ao usar o praziquantel deve-se haver cuidado para que não haja resistência ao medicamento nas espécies de *Schistosoma* (GRYSEEL et al., 2006).

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), cerca de 1/6 da população mundial é acometida por alguma doença negligenciada, afetando principalmente pessoas que residem em áreas rurais ou urbanas em condições precárias (WHO, 2009). No mundo é grande a falta de pesquisa e desenvolvimento de fármacos para as doenças negligenciadas, pois a indústria farmacêutica e o setor público dos países ricos, praticamente não investem na descoberta de medicamentos para pessoas sem poder de compra (O'CONNELL, 2007).

1.3 - COMPOSTOS NATURAIS ANTIESQUISTOSSOMA

Os fármacos usados no tratamento da esquistossomose e leishmaniose, por exemplo, são caros, com necessidade de injeções diárias e acompanhamento hospitalar, além de possibilitar o desenvolvimento de resistência pelos parasitas (MRAZEK et al., 2002). Óleos e extratos de plantas há muito tempo tem sido usada na medicina popular como anti-séptico, cicatrizante, inflamatório, analgésico e dentre outras funções terapêuticas, servindo de base para grandes investigações científicas para a pesquisa da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e plantas medicinais. Vários estudos têm demonstrado que as plantas medicinais localizadas na flora brasileira apresentam uma grande atividade contra vírus, bactérias, fungos e atividades larvicidas (ALMEIDA et al., 2006; ARRUDA et., 2006).

A química moderna permite a síntese de vários medicamentos a partir da utilização de produtos naturais, dentre estes podemos destacar os antimicrobianos que são utilizados na clínica médica com o intuito de curar várias doenças infecciosas apresentando uma alta toxicidade para o microorganismo agente causador da infecção e poucos efeitos colaterais para o organismo afetado (BOXALL et al., 2004).

Os fármacos disponíveis estão “perdendo” a sua ação devido à grande resistência provocada pelo seu uso descontrolado e contínuo, bem como a pouca segurança e alta toxicidade. Estudos e pesquisas vêm descobrindo e contribuindo na descoberta de fármacos naturais seguros, estáveis, padronizados e eficientes que poderão ser utilizados como base para a produção de moléculas sintética apropriada para o desenvolvimento de antimicrobianos, bem como alvos específicos

para doenças virais, bacterianas, fúngicas, parasitárias e até mesmo antitumorais apresentando assim baixa toxicidade para o homem e os animais, fato este que limita o tratamento (YUNES et al., 2001; MALHEIROS et., 2001).

O uso de compostos naturais oriundos de plantas no tratamento e cura de várias doenças é uma prática utilizada pelo homem desde a antiguidade (MACIEL et al., 2002). Vários países utilizam produtos naturais como uma alternativa primária para problemas de saúde, especialmente na Ásia, África e América Latina (ZAGO et al., 2009). As observações e a tradição popular têm sido utilizadas como base para a farmacologia moderna, sendo que as drogas sintéticas utilizadas no tratamento de várias patologias tem origem direta ou indireta, nas plantas medicinais (ZAGO,2009; AMOROZO, 2004).

Os princípios ativos são responsáveis pela ação farmacológica em muitas plantas com atividade medicinal, sendo esta matéria-prima para a indústria farmacêutica. Os principais tipos de compostos utilizados como princípios ativos em medicamentos e cosméticos são: alcaloides, flavonóides, glicosídeos, mucilagens, óleos essenciais e taninos. Estes compostos ativos estão presentes e são encontrados em folhas, sementes, raízes e casca de plantas (BARNABÉ e FLORES, 2008).

O uso de plantas medicinais para a descoberta de novas drogas vem sendo alvo de estudo de vários institutos de pesquisa para o tratamento de várias doenças, sendo um grande impacto para a indústria farmoquímica. A enorme quantidade de compostos ativos ainda não estudados atualmente possibilita a triagem de drogas com eficácia anti-inflamatória, antibacteriana e antiparasitária a partir de moléculas ativas de algumas plantas e extratos (NEWMAN e CRAGG, 2007; KAYSER, 2003).

Com o uso do Praziquantel desde a década de 1970 para o tratamento da esquistossomose, pouco avanço terapêutico foi alcançado e este medicamento passou a desenvolver resistência. Nas últimas décadas os institutos de pesquisa tem procurado estudar extratos e compostos puros oriundos de plantas que tem atividade potencialmente esquistossomicida, como um método alternativo para o controle químico convencional (MORAES, 2012).

A atividade anti-helmíntica de plantas é bem conhecida e utilizada em várias regiões em todo o mundo. Na Ásia, na África estes produtos naturais vêm sendo utilizada tradicionalmente no tratamento da esquistossomose e de outras

parasitoses, onde estas plantas são preparadas por curandeiros que apresentam o conhecimento empírico em comunidades culturais nestas partes do mundo. Devido a isto é necessário estudos para verificar e confirmar o real valor terapêutico destas plantas no tratamento das doenças parasitárias (NDAMBA et al., 1994; SPARG et al., 2000; MOLGAARD et al., 2001; MORAES et al., 2011).

Um estudo feito por Ndamba et al (1994) consistia na investigação de plantas que apresentava atividade esquistossomicida, onde foi realizado uma entrevista com 286 médicos e estes criaram uma lista que continha 47 espécies de plantas oriundas da África que havia sido utilizada no tratamento da esquistossomose urinária. De acordo com esta lista as setes plantas mais utilizadas foram: *Abrus precatorius* (Leguminosae), *Ozoroa insignis* (Anacardiaceae), *Dicoma anômala* (Compositae), *Ximania caffra* (Oleaceae), *Lannea edulis* (Anacardiaceae), *Elephantorrhiza goetzei* (Leguminosae) e *Pterocarpus angolensis* (Leguminosae). Estas plantas foram coletadas e preparadas como descritos pelos médicos, com isso a eficácia destas foi avaliada usando camundongos que foram infectados com cercarias de *S. hematobium*. O preparado a partir da casca da planta *P. angolensis* apresentou atividade contra este parasita semelhante a do praziquantel (MORAES, 2012; FENWICK e WEBSTER, 2006).

Um estudo com extrato de plantas feito por Molgaard et al (2001) pesquisou 23 espécies de plantas que são utilizadas popularmente na Ásia e África para esquistossomose e estas apresentaram atividade anti-helmíntica contra esquistossômulos de *S. mansoni*. Nesta pesquisa os melhores resultados contra as formas adultas foram observadas a partir de extratos do caule e raiz da espécie *Abrus precatorius* (Fabaceae) e casca do caule de *Elephantorrhiza goetzei* (Mimosaceae). Além disso, compostos utilizados no tratamento da malária derivados de artemisina, tal como o arteméter e o artesunato tem mostrado atividade esquistossomicida (UTZINGER et al., 2001; XIAO et al., 2002).

A artemisina é uma lactona que apresenta na sua composição química um grupo endoperóxido, este composto foi isolado das folhas da *Artemisia annua*, esta planta tem sido utilizada há tempos na medicina pelos chineses para a terapêutica de várias doenças. Os primeiros estudos com esta substância iniciou-se no ano de 1970, quando observou que esta apresentava atividade contra malária e a mesma começou a ser usada no tratamento desta patologia (BRAGUINE et al., 2009).

No ano de 1982, cientistas chineses descobriram que a artemisina tinha atividade anti-esquistossoma, com isso várias pesquisas foram feitas e observaram que o arteméter era o responsável por esta propriedade. O derivado de éter metílico da artemisina tinha melhor atividade nas formas jovens do que nas formas adultas de *Schistosoma*, a partir deste pressuposto Utzinger (2001) começou a estudar o mecanismo de ação deste composto, ele observou que o mecanismo de ação da artemisina e seus derivados sobre as espécies de *Schistosoma* é a produção de radicais livres de carbono que destrói as proteínas do parasita (PARREIRA et al., 2010; SANDERSON et al., 2002; XIAO et al., 2000).

Além disso, a microscopia eletrônica de varredura mostrou que a artemisina provoca alterações severas no tegumento do *S. mansoni* com 21 dias de idade (BRAGUINE et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; MORAES et al., 2011; MORAES 2012; PARREIRA et al., 2010; SANDERSON et al., 2002; XIAO et al., 2000).

Estudo de combinação entre praziquantel e artemisina tem sido propostos com o intuito de melhorar a redução da carga do verme (UTZINGER et al., 2001). Atualmente estudos com a artemisina e seus derivados acoplados a metais e a outras drogas para avaliar sua atividade esquistossomicida e de outras parasitoses vem crescendo e estão em andamento, bem como a pesquisa de outros compostos naturais contra *Schistosoma* vem ganhando destaque nas instituições de pesquisa, permitindo a descrição de vários compostos naturais anti-esquistossoma na literatura (LEE, 2007; UTZINGER et al., 2003; XIAO et al., 2002).

Estudos in vivo e in vitro vem sendo realizado a partir de extratos de plantas com o objetivo de descobrir moléculas com atividade esquistossomicida, investigações fitoquímicas estão permitindo conhecer várias substâncias naturais que apresenta esta atividade.

Foram isolados vários compostos da família Piperaceae e esta vem ganhando destaque por apresentar metabólitos ativos biológicos como alcaloides, amido, terpenos e lactona (PRASSAD et al., 2005; KATO & FURLAN, 2007; PARMAR et al., 1997).

Um estudo feito por Moraes et al (2011) mostrou que a amida piplartina, substância encontrada em várias plantas da espécie *Piper*, apresenta atividade esquistossomicida em baixas concentrações, bem como reduz a produção de ovos e

que esta molécula não apresenta efeito citotóxico para células de mamíferos na concentração que esta apresenta efeito anti-esquistossoma (MORAES, 2012).

Veras et al (2012) apresentou dados comprovando que o alcaloide epiisopiloturina, composto secundário isolado a partir das folhas do jaborandi tem atividade tóxica contra o parasita *S. Mansoni* em baixas concentrações. A esquistossomose por ser um problema de saúde pública, vem despertando o interesse de pesquisadores que tem o objetivo de descobrir novos compostos naturais no combate desta patologia pesquisando o seu mecanismo de ação para esta terapêutica, bem como o sinergismo destas substâncias com as drogas já em uso melhorando a eficácia das mesmas no tratamento desta patologia.

1.4 - DIVERSIDADE DA FLORA BRASILEIRA

O homem sempre buscou na natureza formas de manter sua sobrevivência. O emprego de plantas medicinais na terapêutica tem evoluído ao longo dos tempos, desde o tempo das cavernas até as formas modernas de fabricação industrial utilizada pelo o homem (LORENZI et al., 2002). O mundo assiste hoje a uma reformulação de valores pessoais, valores naturais e ecológicos que retornam com grande força, na determinação de novos preceitos, em todas as áreas do conhecimento científico e da vida prática, com isso os produtos naturais e os fitoterápicos ocupam um espaço cada vez maior no mercado (ABFISA 2007; CASTRO, 2004).

A flora brasileira é riquíssima em espécies de plantas com um grande poder medicinal, com existência de muitos princípios ativos identificados em ervas nativas, prontos para serem testados a baixos custos, necessitando, porém de recursos humanos especializados, verbas e equipamentos para o desenvolvimento de pesquisas nessa área (FERREIRA, 2002)

Das 119 substâncias químicas extraídas de plantas para uso medicinal no Brasil, 74% foram descobertas através do conhecimento popular. Somente na Amazônia é sabido que existam cerca de 80 mil espécies vegetais, das quais nem 4% foram estudadas cientificamente (FRANCO, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento, faz uso de plantas medicinais no tratamento de doenças primárias (CARVALHO et al., 2008). O interesse de pesquisa nesta área tem aumentado muito

nos últimos anos onde estão sendo desenvolvidos projetos financiados por instituições públicas e privadas.

Dentre os fatores que tem contribuído para estas pesquisas é o fato da eficiência comprovada de substâncias originadas de espécies vegetais, além de serem matéria-prima para a síntese de fármacos (FOGLIO et al., 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como, pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade; é o produto final acabado, embalado e rotulado (BRASIL, 1995). Estima-se que o mercado fitoterápico movimentava anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega em torno de 100 mil pessoas (ABFISA, 2006). Diante desse número é necessário desenvolver a pesquisa de fitoterápicos no Brasil com o intuito de preservar a nossa biodiversidade e aumentar a produção de medicamentos para a população (NASCIMENTO et al., 2006).

1.5 – PIPERACEAE (*PIPER*)

A biodiversidade brasileira é composta por vários biomas, cerrado, caatinga, mata atlântica e outros. Nestas regiões tropicais e subtropicais estão localizadas cerca de 2000 espécies que constituem o gênero *Piper* que foram nomeadas de *Piperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*. Espécies de *Piper* são encontradas em todos os tipos de vegetação e as outras espécies são mais comuns em áreas frias. A família piperácea, juntamente com outros membros da ordem piperales foi classificada entre as angiospermas basais. A família Piperácea está presente em países pantropical e sua distribuição ocorrem do México ao sudoeste da Argentina. No Brasil estas espécies de piper estão presentes na floresta tropical, que abriga cerca de 283 membros desta espécie (JENSEN et al., 1993; SANTOS et al., 2001; PERIYANAYAGAM et al., 2012)

O composto de grande importância econômica do gênero *Piper* é *piperina piperamide*, que é o princípio ativo da pimenta preta (*Piper nigrum*). Alcalóides e amidas são os principais compostos ativos desta espécie, estudos têm demonstrando a atividade biológica destes compostos secundários, onde se destaca a propriedade anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica e antitumoral (LOPEZ et al., 2010). As amidas encontradas na espécie *Piper* apresentam atividade contra fungos, vários estudos estão disponíveis mostrando sua toxicidade, o sinergismo

eficaz com outras drogas nesta atividade, além da sua atividade inseticida ser bastante conhecida. Esta Classe de produto natural é uma das mais promissoras devido ao seu potencial pesticida, contra vários tipos de insetos e microorganismos (PARRA et al., 2011; FACUNDO et al., 2005).

A presença de amidas bioativas é comum em várias espécies de *Piper*. Outros compostos como ácido benzoico, hidroquinonas, dopamina, terpenóides foram encontradas nas espécies *Piper anducum*, *P. hostmanianum*, *P. crassivernium*, *P. gaudichaudianum* (FACUNDO et al., 2005). Vale ressaltar que o ácido benzoico encontrado nestas espécies de *Piper* tem uma potente atividade contra vários microorganismos.

As hidroquinonas outra classe de composto encontrada nestas espécies tem atividade antitumoral, anti-leucêmica, analgésico e antioxidante apresentando como mecanismo de ação a inibição da mitose (KAOU et al., 2010). Indústrias de cosméticos têm utilizado estas hidroquinonas em loções e cremes com o objetivo de diminuir os sintomas do envelhecimento. A espécie *Piper solmsianum* é de grande importância por que estudos anteriores relataram que este composto tem atividade contra *Trypanosoma cruzi* agente causador da doença de chagas, pesquisas estão em andamento para o tratamento desta patologia, já que não existem medicamentos no mercado farmacêutico com esta propriedade (SILVA et al., 2008).

A família Piperaceae contém fontes bioativas com propriedades biológicas de grande importância com isso os compostos secundários deste membro devem ser estudados detalhadamente para que se possa conhecer o real mecanismo de ação destas substâncias (AHMAD et al., 2011).

As amidas são os principais metabólitos secundários presente na família das piperáceas. No Brasil, em algumas espécies deste gênero, foram encontrados amidas e alcaloides que são classificados em: isobutil, pirrolidinas, piperidina. A espécie *P. Tuberculatum* é encontrada em algumas cidades da região Nordeste, e esta apresenta um fruto que tem o nome popular de pimenta “longa” sendo utilizado como tempero na alimentação e na medicina popular devido às propriedades biológicas que apresenta (FOURNET et al., 1996).

Estudos relatam a presença de várias amidas nesta espécie de piperácea, com destaque para a amida piplartina AHMAD et al., 2011). Nos últimos anos os metabólitos secundários, principalmente as amidas e alcalóides presentes no gênero

Piper, tem recebido uma atenção considerável devido às propriedades biológicas de grande relevância que estes apresentam. Estudos também relatam que as amidas em particular tem atividade contra febre, asma, bronquite, reumatismo e doenças gastrointestinais (AHMAD et al., 2011; FIGUEIREDO e SAZIMA et al., 2000).

A piplartina {5,6-dihidro-1[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-trans-2-propenyl]-2(1H) pyridone} (figura 5) é uma amida, metabólito secundário encontrado em espécies do gênero *Piper*, esta amida apresenta atividade ansiolítica, anti-depressiva, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, antiagregação plaquetária, antiproliferativa e antimitótica in vivo e in vitro (BEZERRA et al., 2007; BRAZ FILHO et al., 1981). A piplartina pode ser isolada com rendimento na faixa de 1% (BRAZ FILHO et al., 1981; COTINGUIBA et al., 2009). Foi relatado efeito inseticida desta amida para formigas e lagartos, bem como resultado contra fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioedes*. Pesquisas tem relatado atividade antiparasitária in vitro desta substância em *Leishmania donovani* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, bem como a atividade esquistossomicida em baixas concentrações contra a espécie *S. mansoni* (MORAES et al., 2012; BEZERRA et al., 2007; BODIWALA et al., 2007; NAVICKIENE et al., 2000; SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2001).

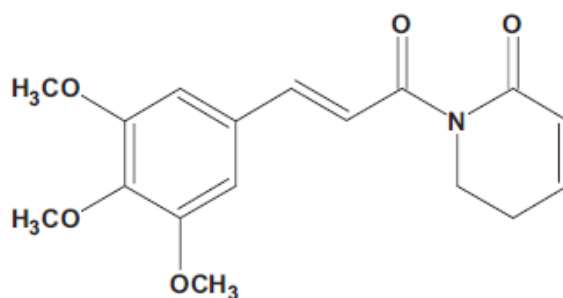


Figura 5. Estrutura molecular da amida piplartina

1.6 - JABORANDI

Vários vegetais já foram classificados sob o nome jaborandi, principalmente aquelas que possuem características semelhantes, como algumas espécies de *Piper* (Piperaceae), *Verbena* (Verbenaceae) e *Herpestis* (*Bacopa*, Scrophulariaceae), e até mesmo algumas outras espécies de Rutaceae como os

gêneros *Esenbeckia*, *Zanthoxylum* e *Monnieria* (JOSEPH 1967; HOLMSTEDT *et al.*, 1979).

O jaborandi (*Pilocarpus* sp.) representa uma das espécies comerciais, econômica e médica mais importantes encontradas na flora brasileira, planta utilizada como matéria prima para o isolamento de vários princípios ativos de interesse para a indústria farmoquímica e farmacêutica. O gênero neotropical *Pilocarpus* contém 17 espécies descritas, 9 subespécies e 12 variedades que se distribuem no continente Americano, indo do Sul da América Central (México) até o Sul da América do Sul (Argentina, Paraguai e Brasil).

Quatorze espécies são encontradas no Brasil, sendo 11 exclusivos do território brasileiro: *P. alatus* C. J. Joseph ex Skorupa, *P. carajaensis* Skorupa, *P. giganteus* Engler, *P. grandiflorus* Engler, *P. jaborandi* Holmes, *P. pauciflorus* St. Hilaire, *P. pennatifolius* Lemmaire, *P. riedelianus* Engler, *P. spicatus* St. Hilaire, *P. sulcatus* Skorupa, *P. trachyllophus* Holmes, *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth e *P. peruvianus* (Macbride) Kaastra. Dentre estas espécies nativas e cultivadas no Brasil, vale ressaltar o *P. microphyllus*, que é utilizada como matéria prima para isolamento de farmoquímicos (SANTOS & MORENO, 2004). Deste gênero já foram identificados quatorze tipos de alcalóides, além destes foram identificados alguns outros metabólitos secundários, os quais podem destacar: cumarinas, flavanóides, hidrocarbonetos, trieterpenos e óleos vegetais.

O Jaborandi é perene e pouco ramificado. As plantas conhecidas como jaborandi (gênero *Pilocarpus*) pertencem à família Rutaceae e apresentam altura média de 2 metros, com folhas compostas medindo cerca de 40 cm quando adultas folíolos coriáceos, de forma lanceolada, variando com a espécie e flores pequenas dispostas em racimos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso (MARQUES *et al.*, 1994; HENRIQUES *et al.*, 2000; PAIVA, 2008, MIURA, 2009).

Em 1873, o jaborandi foi apresentado à medicina ocidental, quando a folha foi levada para a Europa pelo português Symphrônio Coutinho. Seu valor em oftalmologia foi uma descoberta secundária. O que despertou o grande interesse da medicina francesa por esta espécie foi a sua utilização entre os índios brasileiros, para provocar salivação e suor profuso. Ironicamente este efeito no sistema nervoso que foi abandonado por muito tempo, foi retornando recentemente ao uso clínico

(PINHEIRO, 2002). Esta planta não apresenta somente o fato de sua importância econômica e medicinal, mas está principalmente relacionada ao seu papel ecológico, onde esta espécie nativa é ombrófila e secundária e em programas de reflorestamento é utilizada para o enriquecimento das espécies (LOPES, 2008).

O seu poder para a indústria farmacêutica está relacionado por ser a única fonte natural de pilocarpina, bem como as altas concentrações extraídas deste alcalóide são oriundas das folhas do jaborandi, um princípio ativo utilizado para produzir aumento na contração da musculatura lisa e relaxamento de esfíncteres de todo organismo animal (VITAL e ACCO, 2006).

Esta substância não apresenta efeitos colaterais, quando comparadas a outras substâncias utilizadas no tratamento do glaucoma e da xerostomia. O jaborandi, por ser uma planta com vários benefícios terapêuticos, comercial e ecológico, deve ser preservado evitando assim sua extinção (SABÁ et al., 2002).

A extração e valorização do jaborandi são responsáveis por gerar recursos e renda nos seus estados produtores. Segundo o IBGE no ano de 2006 a extração desta planta movimentou cerca de 220 toneladas nas regiões do Norte e Nordeste Brasileiro perfazendo aproximadamente R\$ 562.000,00 de um total de R\$ 3,7 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil neste mesmo ano (IBGE, 2006).

1.7 - ALCALÓIDES ORIUNDOS DO JABORANDI

A palavra alcalóide deriva do árabe *al-quali* que corresponde ao nome vulgar do vegetal onde a soda foi inicialmente extraída. Este grupo de compostos apresenta difícil definição, devido à grande diversidade de estruturas químicas na sua composição molecular, propriedades físico-químicas e ações farmacológicas mesmo em baixas doses. (SIMÕES *et al.*, 2002; ROBBERS *et al.*, 1997; MIURA 2009).

Alcalóides são substâncias de caráter básico, derivadas principalmente de plantas, mas que também podem ser encontradas em fungos, bactérias e até mesmo em animais, quais contêm, em sua fórmula, basicamente: nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono, e que podem influenciar o metabolismo destes organismos produtores. Possuem importância política, econômica e social, além de biológica (VERAS, 2009; HENRIQUES *et al.*, 2000).

Existe um consenso entre diversos autores e pesquisadores da área onde os mesmos definem como alcalóides verdadeiros os compostos de origem vegetal que possuem um ou mais nitrogênio(s) pertencente a um anel heterocíclico com propriedades básicas apresentando intensa atividade biológica quando em contato com organismos vivos (SIMÕES *et al.*, 2002; Costa, 1994; ROBBERS *et al.*, 1997). As drogas vegetais alcaloídicas desde os primórdios até hoje são fontes de obtenção de princípios ativos naturais através da extração, isolamento e purificação direta bem como constituem uma fonte de novas drogas, protótipos para obtenção de novas moléculas farmacologicamente ativas, através de semi-síntese e síntese orgânica (LIMA, 2009).

No jaborandi já foram identificadas as estruturas dos seguintes alcalóides: pilocarpina (1), isopilocarpina (2), pilocarpidina (3), isopilocarpidina (4), pilosina (5), isopilosina (6), epiisopilosina (7), epiisopiloturina (8), 13-nora-7(11)-dehidropilocarpina (9), N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina (10), N,N-dimetiltriptamina (11), plastidesmina (12), (1H)-4-metoxi-2-quinolone (13) e dictamina (14) (Figura 7).

A partir do gênero *Pilocarpus* já foram identificados vários alcalóides, porém muitos estão em fase teste ou ainda não tem propriedades farmacológicas conhecidas, mas apresentam suas estruturas moleculares determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), dentre estas podemos citar os alcalóides imidazólicos: isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina promissores para a medicina humana e veterinária.

Alcalóides azóis e seus derivados, como os identificados no jaborandi, são antimicóticos clássicos, de largo espectro e despertam interesse de grandes indústrias farmoquímicas e farmacêuticas nacionais e multinacionais, sendo um dos grupos químicos de ocorrência vegetal mais importantes do ponto de vista econômico, político, social, médico e farmacêutico (ABFISA, 2007; SANTOS *et al.*, 2004; ANDRADE NETO, 1997).

Os alcalóides constituem um grupo de compostos muito heterogêneo e desta forma são classificados de acordo com a estrutura química básica do núcleo químico da qual derivam, com isso são classificados em alcalóides de núcleo: tropano, imidazólicos, quinolizídínicos, quinoleínicos, isoquinoleínicos, esteroidais, fenantrênicos, benzênicos, purínicos e alcalóides de núcleo não-heterocíclico ou protoalcalóides (SIMÕES *et al.*, 2002; ROBBERS *et al.*, 1997; COSTA, 1994). Os

alcalóides citados anteriormente são classificados como imidazólicos por apresentar na sua estrutura química um núcleo imidazólico.

Os derivados azólicos são compostos sintéticos que podem ser classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico, os imidazóis são representados pelo cetoconazol, miconazol e clotrimazol, onde estes são usados como terapia tópica. Os derivados triazólicos são representados pelo itraconazol, fluconazol e voriconazol.

O principal mecanismo de ação dos azóis é a inibição da síntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos microorganismos, sobretudo os fungos. Os imidazólicos atuam mediante a inibição da enzima lanosterol 14 α – demetilasa no complexo citocromo P450 dos fungos, onde o resultado é a inibição da conversão de lanosterol em ergosterol, com a depleção conseguinte de ergosterol, acumulação de precursores e perda da integridade da membrana do microorganismo.

Os compostos imidazólicos e triazólicos inibem o metabolismo de outros compostos devido sua interferência em diferentes isoenzimas do complexo P450 do ser humano. A especificidade das drogas azólicas resulta da sua maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450 do que pelas enzimas humanas do citocromo P450 (SILVA et al., 2006).

A depleção resultante de ergosterol altera a fluidez da membrana e isto interfere na ação das enzimas associadas à membrana, o efeito líquido é a inibição da replicação. Os azóis inibem também a transformação das células de leveduras de cândidas em hifas a forma invasiva e patogênica do parasita.

A resistência dos azóis à frente de várias cepas fúngicas está aumentando devido ao uso crescente desses fármacos na profilaxia e tratamento, condicionando a seleção da resistência clínica a essas drogas.

A Pilocarpina (Figura 6) isolada a partir da espécie *Pilocarpus microphyllus*, agente mais concentrado nas folhas da planta do jaborandi apresenta uma ação colinérgica direta que estimula o sistema parassimpático (bexiga, ductos lacrimais, sudoríparas e glândulas salivares) apresentam na estrutura de uma amina terciária. Este alcalóide é a droga eleita no tratamento do glaucoma (KOROLKOVAS, 1996) e a sua propriedade sialagoga tem sido explorada para tratar a xerostomia (boca seca)

causada pelo rádioterapia ou quimioterapia de câncer de garganta ou aqueles na área da cabeça (MILLER, 1993;. VALDEZ et al, 1993).

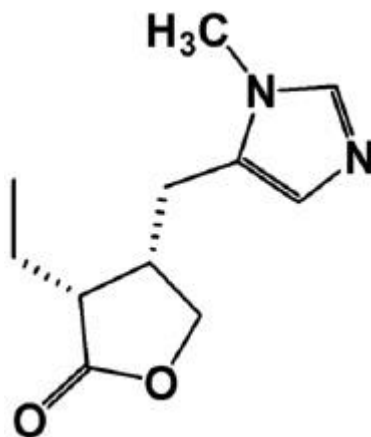


Figura 6: Estrutura química da Pilocarpina

A pilocarpina além de ser utilizada na medicina humana para o tratamento das doenças citadas acima, ela apresenta um grande valor terapêutico para a medicina veterinária, onde esta é utilizada no tratamento de disfunções gastrointestinais de ruminantes e meteorismo dos equinos, objetivando a estimulação da musculatura lisa do trato gastroentérico, a fim de produzir catarse (LARSSON et al., 2008).

A epiisopiloturina difere da pilocarpina pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico, e assemelha-se a ela por sua estrutura formada pela presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C. A similaridade entre as estruturas destes dois compostos torna a epiisopiloturina um alcalóide promissor quanto as suas propriedades biologicamente ativas (LIMA, 2009; VERAS et al., 2012).

Estudos recentes demonstram que este alcaloide epiisopiloturina apresenta atividade contra o parasita *S. mansoni*, sendo letal para as formas adulta e jovem em baixas concentrações, a imagem de microscopia confocal mostrou que esta molécula provoca alterações morfológicas na superfície externa do verme provocando destruição dos tubérculos.

1.8 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS

1.8.1 - ISOBOLOGRAMA

Atualmente a associação de dois medicamentos ou mais tem como objetivo principal aumentar a eficácia do fármaco, diminuir a resistência, as dosagens individuais e os possíveis efeitos colaterais de cada um (NEUSA et al., 2008). A interação decorrente da associação é matéria de importante preocupação e investigação. A farmacologia utiliza como nomenclatura para classificar estas interações os termos sinergismo, adição e antagonismo. Nos estudos de interação entre medicamentos, as metodologias usadas para definir o tipo de associação são: isoblograma e índice de combinação (IC). Sinergismo consiste na resposta farmacológica obtida da associação de duas ou mais drogas, cuja resultante, é maior do que os efeitos isolados de cada uma delas. O sinergismo pode ocorrer com drogas que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que agem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). No antagonismo a resposta farmacológica de uma droga é eliminada ou reduzida na presença de outro, muitas vezes pela competição destes pelo mesmo sítio receptor (NIES; SPIELBERG, 1996).

O isoblograma foi primeiramente empregado na farmacologia e utilizado na área de defensivos agrícolas por Tammes (1964), O isoblograma é bastante empregado no estudo de associações de herbicidas e inseticidas como também na comprovação de resistência de plantas a herbicidas e na influência de fatores ambientais no seu desempenho (KRUSER et al., 2006).

Essa curva consiste em demonstrar a atividade biológica de uma associação às doses crescentes de medicamentos ou agentes químicos administrados de forma isolada e combinados entre si, de forma a se obter doses equidistantes em escala logarítmica. Via de regra obtém-se uma curva simétrica em formato sigmoidal, que pode ser ajustada pelo modelo logístico. Os dados são tratados por análise de regressão linear. Desse ajuste obtém-se a estimativa da dose que provoca 50% (ou outro percentual estipulado) do efeito total possível na variável resposta analisada (Chism et al.1992). O isoblograma é a representação gráfica das doses isoladas e em associação que causam a mesma porcentagem em relação ao efeito estipulado.

Estudos feitos em 1983, por Shaww e Brammer, utilizaram o isoblograma para demonstrar a associação entre Praziquantel e Oxamniquina.

No isoblograma os valores de I_{50} , dos produtos isoladamente são distribuídos nas coordenadas X e Y e juntas irão formar uma linha conhecida como isobolo de aditividade ou linha isobolográfica. Os valores de I_{50} obtidos a partir da associação entre os produtos em diferentes concentrações podem ser avaliados em relação a sua posição frente ao isobolo de aditividade ou linha isobolográfica. Se os pontos relacionados à associação estiverem ao redor da isobole de aditividade, é adição, abaixo, a resposta é sinérgica, e acima do isobolo de aditividade é antagonismo (TAMMES, 1964).

1.8.2 - ÍNDICE DE COMBINAÇÃO

O índice de combinação (I_{comb} ; IC) é outro método complementar para analisar o efeito de produtos aplicados isoladamente e em associação. Este índice é baseado no princípio da atividade de Loewe, onde são relacionados as doses dos compostos capazes de causar 50% de mortalidade quando os fármacos são administrados em associação com as doses que causam 50% de mortalidade, quando os fármacos são utilizados isoladamente. Quando este índice equivale a uma unidade, ou seja, 1, indica aditividade, quando maior, indica antagonismo e quando menor, indica sinérgico (Ramakrishnan e Jusko, 2001).

O cálculo do I_{comb} é dado pela seguinte expressão:

$$I_{Comb}, IC = LC_{50ab1}/LC_{50a} + LC_{50ab2}/LC_{50b}$$

Onde I_{50ab1} e I_{50ab2} são as doses capazes de causar 50% de dano quando os fármacos são administrados em associação e I_{50a} e I_{50b} as doses capazes de causar 50% de dano quando os fármacos são administrados isoladamente (Ramakrishnan e Jusko, 2001).

Devido aos relatos de resistência e efeitos indesejáveis do Praziquantel (PZQ) e oxamniquina no tratamento da esquistossomose, estudos de combinações entre praziquantel/mefloquina; praziquantel/artemisina; praziquantel/oxamniquine em busca de novas alternativas para a terapia desta patologia apresentaram atividade *in vitro* contra o parasita *S. mansoni* (KEISER et al., 2011; UTZINGER et al., 2003) e que a combinação entre fármacos aumentam a atividade farmacológica e diminui o

efeito colateral, este trabalho tem como objetivo, a avaliação do efeito combinado entre o alcaloide episopiloturina, amida piplartina e a droga de referência praziquante e efeitos isolados de análogos da piplartina na atividade contra o parasita *S.mansoni*.

REFERÊNCIAS

ABDLEY. H.M., GRAYBILL, J.R., LOEBENNERG, D., MELBY, P.C., EFFICACY OF THE TRIAZOLE SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 2910. 1999.

ABIFISA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO). **Uma legislação justa para os produtos de origem natural**, 2006. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>. Acesso em: 21 ago. 2008.

ABREU, I.N., SAWAYA, A.C.H.F., EBERLIN, M.N., MAZZAFERA, P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph.). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, p. 806- 811. 2005.

AGRA, M.F; SILVA, Q.N.; BASÍLIO, I.J.L.B.; FREITAS, P.S.; BARBOSA FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.3, 2008.

ALMEIDA, M. A. O.; AYRES, M. C. C. Considerações gerais sobre os helmintos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIARK, S. L; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.519-550.2006.

ALMEIDA, R. L.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, A. D. S.; MENANI, J. V.; RENZI, A. Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpina induced salivary secretion, **Brain research**, n. 1085, p. 144–148. 2006.

ANDRADE, S. F.; FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. ; ANDRADE NETO, J. P.; KANASHIRO, G. P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 492-513.

ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M.T.P.; SANTOS, R.H.A. 24-methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p.739-743. 1994.

ANSARI, M. A., RAZDAN, R. K., TANDON, M., VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 207-211. 2000.

ARAUJO, S.C., MATTOS, A.C.A., TEIXEIRA, H.F., COELHO, P.M.Z., NELSON, D.L., OLIVEIRA, M.C., Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International journal of pharmaceutics**, v. 337, p. 307–315. 2007.

ARAUJO, R.V.; MELO-JUNIOR, M.R.; BELTRAO, E.I.; MELLO, L.A.; IACOMINI, M.; CARNEIRO LEAO, A.M.; CARVALHO, L.B. JR & SANTOS-MAGALHAES, N.S. Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Vol.44, pp. 311-318. 2011.

ARAÚJO, N. Associação de fármacos na terapêutica experimental da esquistossomose mansoni/Tese de Doutorado-Belo Horizonte, 2010.

ARAÚJO, N.; MATTOS, A.C.A.; SARVEL, A.K.; COELHO, P.M.Z.; KATZ, N. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis mansoni. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**.103 (5): 450-454.2008.

ARAÚJO, N.; MATTOS, A.C.A.; COELHO, P.M.Z.; KATZ, N. Association of oxamniquine, praziquantel and clonazepam in experimental schistosomiasis mansoni. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**. 103 (8):781-785.2008.

AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; DA SILVA, C. S. B.; SANTOS, G. K. N.; DA CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284-2288. 2009.

BADRIA, F.; ABOU MOHAMED, G.; EL-MOWAFY, A.; MASSOUD, A. & SALAMA, O.. Mirazid: a new schistosomicidal drug. **Pharmaceutical Biology**, Vol.39, p. 127–131. 2001

BALDE, A.M.; VAN MARCK, E.A.; KESTENS, L.; GIGASE, P.L. & VLIETINCK, A.J. Schistosomicidal effects of *Pavetta owariensis* and *Harrisonia abyssinica* in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, Vol.55, p. 41-43. 1989.

BANETH, G.; SHAW, S. E., Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 106, p. 315–24. 2002.

BAPTISTA NETO, C. **Avaliação do uso da pilocarpina em pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço para controle da xerostomia**. 2003. BARATA, L. S. Fitoterápicos *on line* - 2004. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagem/farmacos/farma16/htm>>. Acesso em: 14 nov.2012

BARRADAS, J. S.; ERREA, M. I.; D'ACCORSO, N. B.; SEPÚLVEDA, C. S.; TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2468–2474. 2008.

BARTH, L.R.; FERNANDES, A.P.; RIBEIRO-PAES, J.T. & RODRIGUES, V. Effects of goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.92, pp. 427–429. 1997.

BENKO, I.; HERNÁDI, F.; MEGYERI, A.; KISS, A., SOMOGYI, G.; TEGYEY, Z.; KRAICSOVITS, F.; KOVÁCS, P. Comparison of the **toxicity** of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte -macrophage progenitor cells *in vitro*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 675-681.1999.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J. & MCMANUS, D.P. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control, **PLoS Neglected Tropical Disease**, Vol.2, p. e244. 2008.

BEZERRA, D.P.; PESSOA,C; MORAES, M.O;SAKER-NETO,N; SILVEIRA, E.R; LOTUFO, L.V.C. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**.V. 48,pp 453–463. 2013.

BEZERRA, D.P., MILITÃO, G.C., DE CASTRO, F.O., PESSOA, C., DE MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R.,LIMA, M.A., ELMIRO, F.J., COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**. 21, 1–8. 2007.

BEZERRA, D.P., VASCONCELLOS, M.C., MACHADO, M.S., VILLELA, I.V., ROSA, R.M., MOURA, D.J.,PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., LIMA, M.A., AQUINO, N.C., HENRIQUES, J.A.,SAFFI, J., COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. **Mutation Research**.677, 8–13.2009.

BEZERRA, D.P., DE CASTRO, F.O., ALVES, A.P., PESSOA, C., DE MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R.,LIMA, M.A., ELMIRO, F.J., DE ALENCAR, N.M., MESQUITA, R.O., LIMA, M.W., COSTA-LOTUFO, L.V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**. 28, 156–163. 2008.

BOTROS, S.; WILLIAM, S.; EBEID, F.; CIOLI, D.; KATZ, N.; DAY, T.A.; BENNETT, J.L. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.71, p. 206-210. 2004.

BOTROS, S.; SAYED, H.; EL-DUSOKI, H.; SABRY, H.; RABIE, I.; EL-GHANNAM, M.; HASSANEIN, M.; EL- WAHAB, Y.A. & ENGELS, D. Efficacy of mirazid in comparison with praziquantel in Egyptian *Schistosoma mansoni*-infected school children and households. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.72, p. 119- 123. 2005.

BOTROS, S. S., BENNETT , J. L. Praziquantel resistance. **Expert Opin Drug Discov.**, v. 2, p. S35–S40, 2007.

BOXALL, A.A.; FOGG, A.L.; BLACKWELL, P.A.; KAY, P.; PEMBERTON, E.J.; CROXFORD, A. Veterinary medicines in the environment. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, v.180, p. 1-91. 2004.

BRAGUINE, C.G.; COSTA, E.S.; MAGALHAES, L.G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A.; BASTOS, J. K.; SILVA, M.L.; CUNHA, W.R.; JANUARIO, A.H. & PAULETTI, P.M. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. Zeitschrift für Naturforschung. C, **Journal of biosciences**, Vol.64, p. 793-797. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria n. 6 de 31 de janeiro de 1995**. Diário Oficial da União de 31 de Janeiro de 1995. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 21 maio.2013

BROADHEAD, C.L. & BOTTRILL, K. Strategies for replacing animals in biomedical research. **Molecular Medicine Today**, Vol.3, p. 483-487. 1997.

BUTT, G. M. Drug-induced xerostomia. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 57, p. 391-393. 1991.

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, Vol.11, pp. 433–439. 2007.

CAMARGO, E. P. Estudos avançados. **Tropical diseases**, v. 22, p. 95-110. 2008.

CASTRO, D.M. Homeopatia, plantas medicinais e ambiente. **Revista de Ação Ambiental**, v.10. n. 1. 2004.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.185-189. 2000.

Chou, T.C. Drug combinations: from laboratory to practice. **J. Lab. Clin. Med.** 132, 6-8. 1998.

CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in Infectious Diseases**, Vol.13, pp. 659-663. 2000.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. & ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future?. **Pharmacology & therapeutics**, Vol.68, pp. 35-85. 1995.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitology Today**, Vol.14, pp. 418-422. 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, v. 4, p. 360-369. 1969.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p. 370-722.

COSTA, M. C. B.; NASCIMENTO NETO, O. C. Aspectos básicos da farmacoterapia ocular. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1190-1201.

COSTA, P.V. Processo de obtenção e purificação de pilocarpina e seus sais. BR Pat. PI9203183, 1999-07-06. p.8.

CUPP-VICKERY, J. R., GARCIA, C., HOFACRE, A., MCGEE-ESTRADA, K. Ketoconazole-induced Conformational Changes in the Active Site of Cytochrome P450eryF. **Journal of molecular biology**, v. 311, p.101-110. 2001.

DA SILVA FILHO, A.A.; RESENDE, D.O.; FUKUI, M.J.; SANTOS, F.F.; PAULETTI, P.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; GREGORIO, L.E.; BASTOS, J.K. & NANAYAKKARA, N.P. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, Vol.80, pp. 478–482. 2009.

DAVIES, S.G., ROBERTS, P.M., STEPHENSON, P.T., THOMSON, J.E. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p.3509–3512. 2009.

DE ARAÚJO, S.C.; DE MATTOS, A.C.; TEIXEIRA, H.F.; COELHO, P.M.; NELSON, D.L.; DE OLIVEIRA, M.C. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **Int.J.Pharm.** 33, 307-315.2007.

DE CLERCQ, D., J. VERCRUYSSSE, P. VERLE´, A. KONGS, AND M. DIOP. What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? **Trop. Med. Int. Health** 5:744–746. 2000.

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

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

De MORAES, J. Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. 2011. 236 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – **Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, Brasil, 2011.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Exp. Parasitol.** 132, 222-227. 2012.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M. LA quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular

cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, Vol.115, pp.61-69. 1988.

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

DRASAR, P. Chem. Listy 101 (7) 618–619. 2007

DUH, CHANG-YIH., YANG-CHANG, W.V. and SHANG-KWEI, W. Cytotoxic Pyridone Alkaloids From Piper Aborescens. **Phytochemistry**. 29, No. 8, Pp. 2689-2691.1990.

DUQUENOY, P.; RUYSSCHAERT, J. M. Interaction between lipids and miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2, p. 129–134. 1993.

EL-ANSARY, A.K. AHMED, S.A. & ALY, S.A. Antischistosomal and liver protective effects of *Curcuma longa* extract in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, Vol.45, pp. 791–801. 2007.

EL-BANHAWEY, M.A.; ASHRY, M.A.; EL-ANSARY, A.K. & ALY, S.A. Effect of *Curcuma longa* or praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice liver—histological and histochemical study. **Indian Journal of Experimental Biology**, Vol.45, pp. 877–889. 2007.

EL RIDI, R.; ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA, H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S.H.; FAHMY, O.M. *In vitro* and *in vivo* activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol.54, pp. 3383-3389. 2010.

EL SHENAWY, N.S.; SOLIMAN, M.F. & REYAD, S.I. The effect of antioxidant 1 properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as antischistosomiasis agents in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Vol.50, p. 29-36. 2008.

ESCARON, C. J., LEES, D. M., TEWARI, R., SMITH, D. F., CARON, E. A simple, robust and versatile method to characterise intracellular parasitism. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, p. 72-76. 2007.

FACUNDO, V.A., SILVEIRA, A.S.P., MORAIS, S.M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). **Biochem. Syst. Ecol.** 33 (7), 753–756. 2005.

FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; ROBERT BERGQUIST, N. & TODD, M.H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, Vol.19, pp.509-515. 2003.

FENWICK, A. & WEBSTER, J.P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Vol.19, pp. 577–582. 2006.

FERREIRA, J.F.; PEADEN, P. & KEISER, J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: Trematocidal plant alcoholic extracts. **Parasitology Research**. 2011.

FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 73-90.

FERGUSON, M. M. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction, **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 75, p. 186–191. 1993.

FOX, P. C.; ATKINSON, J. C.; MACYNSKI, A. A.; WOLFF, A.; KUNG, D. S.; VALDEZ, I. H.; JACKSON, W.; DELAPENHA, R. A.; SHIROKY, J.; BAUM, B. J. Pilocarpine treatment of salivary gland hypofunction and dry mouth (xerostomia). **Archives of Internal Medicine**, v. 151, p. 1149-1152. 1991.

FRICCIUS, H.; POHLA, H.; ADIBZADEH, M.; SIEGELS-HÜBENTHAL, P.; SCHENK, A.; PAWELEC, G. The effects of the antifungal **azoles** itraconazole, fluconazole,

ketoconazole and miconazole on cytokine gene expression in human lymphoid cells. **International journal of immunopharmacology**, v. 14, p. 791–799. 1992.

FRISCH, M.J., Chem. Listy 100 (4) p. A9–A9. 2006.

GOBERT, G.N.; CHAI, M. & MCMANUS, D.P. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. **Parasitology**, Vol.134, pp. 453-460. 2007.

GOLD, D. Assessment of the viability of *Schistosoma mansoni* schistosomula by comparative uptake of various vital dyes. **Parasitology Research**, Vol.83, pp. 163-169. 1997.

GOLENSER, J.; WAKNINE, J.H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.H. & GRAU, G.E Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, Vol.36, pp. 1427-1441. 2006.

GUIMARÃES, M. A., CAMPELO, Y. D. M., VÉRAS L. M. C., COLHONE, M. C., LIMA, D. F, CIANCAGLINI, P., KUCKELHAUS, S. S., LIMA, F. C. A., MORAES, J., LEITE, J. R. S. A. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and In Vitro Schistosomicidal Activity. **J. Nanosci. Nanotechnol.** Vol. 13, p. 1-13. 2013.

GUIMARÃES, M.A. Efeito do alcaloide epiisopiloturina em esquistossômulos e na aptidão reprodutiva de *Schistosoma mansoni*. 2012. 67F. Trabalho de Conclusão de Curso-Bacharelado em Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2012.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J. & KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, Vol.368, pp. 1106–1118. 2006.

HADJ-ESFANDIARI, N.; NAVIDPOUR, L., SHADNIA, H., AMINI, M., SAMADI, N., FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolymethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, p. 6354–6363. 2007.

HAGAN, P.; APPLETON, C.C.; COLES, G.C.; KUSEL, J.R. & TCHUEM-TCHUENTE, L.A. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends in Parasitology**, Vol.20, pp.92–97. 2004.

Harries, A.D.; Dye, C. Tuberculosis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**100, 415-431. 2006.

HARROP, R. & WILSON, R.A. Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Vol.107, pp. 265-274. 1993.

HAMLAR, D. D.; SCHULLER, D. E.; GAHBAUER, R. A.; BUERKI, R. A.; STAUBUS, A. E.; HALL, J.; ALTMAN, J. S.; ELZINGA, D. J.; MARTIN, M. R. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. **Laryngoscope**, v. 106, n. 8, p. 972-976. 1996.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.RH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2000. p.641-656.

IBGE, **Prod. Extr. veg. e Silvíc.**, Rio de Janeiro, 2006. v.21, p.1-45.

JARAMILLO, M.A. & MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, Vol.88, pp. 706–716. 2001.

JATSA, H.B.; NGO SOCK, E.T.; TCHUEM TCHUENTE, L.A. & KAMTCHOUING, P. 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**, Vol.6, pp. 216-221. 2009.

JOHNSON, J. T.; FERRETTI, G. A.; NETHERY, J.; VALDEZ, I. H.; FOX, P. C.; NG, D.; MUSCOPLAT, C. C.; GALLAGHER, S. C. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 390 – 395. 1993.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). **Mecânica Popular**, v. 40, p. 1-9. 1967.

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

KATO, M.J. & FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, Vol.79, pp. 529–538. 2007.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, Vol.90 (Suppl 2), pp. S55-S62. 2003.

KEISER, J.; MANNECK, T.; VARGAS, M. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and in vitro. **J. Antimicrob. Chemother.** 66, 1791-1797. 2011.

KEISER, J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. **Parasitology**, Vol.137, pp. 589-603. 2010.

KEISER J, VARGAS M, VENNERSTROM J L. Activity of antiandrogens against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. **J Antimicrob Chemother.**65: 1991 – 5. 2010

KEISER J, N'GUESSAN NA, ADOUBRYN KD et al. Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, and praziquantel against *Schistosoma haematobium*: randomized, exploratory open-label trial.**Clin Infect Dis.**50: 1205 – 13. 2010

KEISER, J. & UTZINGER, J. Advances in the discovery and development of trematocidal drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Vol.2 (Suppl 1), pp. S 9–23. 2007.

KHABNADIDEH, S.; REZAEI, Z.; KHALAFI-NEZHAD, A.; BAHRINAJAFI, R.; MOHAMADI, R.; FARROKHROZ, A. A. Synthesis of N-Alkylated derivatives of

imidazole as antibacterial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, p. 2863–2865. 2003.

KOWALSKA-PYLKA, A. H.; MAYER-DZIEDZIC, B.; NIEWIADOMY, A.; MATYSIAK, J. Evaluation of substituted benzthioanilides toxicity using in vitro tests. **Atla**, v. 29, p. 547-556. 2001.

KRUSE, N.D, VIDAL, R.A e TREZZI, M.M. Dose-Response Curve and Isobologram Used to Describe the Mixture of Herbicides Inhibitors of the Photosystem II and Carotenoid Synthesis. **Planta Daninha**. v. 24, n. 3, p. 579-587, 2006

LAMPIRIS, H. W; MADDIX, D. S. Uso clínico dos fármacos antimicrobianos. In: KATZUNG, B.G. (Ed). **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara *Koogan*, 2006, Cap. 51, p. 699-711.

LARSSON, C. E.; LARSSON JR., C. E.; LEITE, C. A. L.; ANDRADE, S. F.; BRITO, A. F., Terapêuticas Tópica e Sistêmica: Pele, Ouvido e Olho. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca , 2008. p. 179-186.

LEE, S. Artemisinin, promising lead natural product for various drug developments. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Vol.7, pp. 411-422. 2007.

LEITE, J.R.S.A.; MIURA, L.M.C.V.; LIMA, D.F. CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A.; MORAES, J. & BATISTA, M.C.S. Processo de obtencao da epiisopiloturina e sua aplicacao no combate a infeccoes parasitarias. PI 0904110-9 A2 *Revista de Propriedade Industrial, Instituto Nacional de Prodiedade Industrial*, No 2108, pp. 132. 2011.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P-450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 467–477. 2007.

LIMA, C. C.; CRIDDLE, D. N.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MONTE, F. J.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta medica**, v. 66, p. 408-411. 2000.

LIMA, C.M. ; FREITAS, F.I.; MORAIS, L.C.; CAVALCANTI, M.G.; SILVA, L.F.; PADILHA, R.J.; BARBOSA C.G.; SANTOS, F.A.; ALVES, L.C. & DINIZ, M.D. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2011.

LIMA, D.F. **Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos**. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Plantas Mediciniais) – Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LYDDIARD, J.R.; WHITFIELD, P.J. & BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). **The Journal of Parasitology**, Vol.88, pp. 163-170. 2002.

LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J. Quimioterapia das infecções por helmintos. In: BRUNTON, L. L.(Ed.) GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2006. p. 963-981.

MACIEL M.A.M, PINTO A.C, VEIGA J.R V.F Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Quim Nova**, 25: 429-438. 2002.

MAGALHAES, L.G.; MACHADO, C.B.; MORAIS, E.R.; MOREIRA, E.B.; SOARES, C.S.; DA SILVA, S.H.; DA SILVA FILHO, A.A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, Vol. 104, pp. 1197- 1201. 2009.

MCKINNON,J.J., SPACKMAN,M.A., MITCHELL A.S. **Acta Crystallogr. B – Struct. Sci.** 60 627–668. 2004.

MAGALHAES, L.G.; KAPADIA, G.J.; DA SILVA TONUCCI, L.R.; CAIXETA, S.C.; PARREIRA, N.A.;RODRIGUES, V. & DA SILVA FILHO .*In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, Vol.106, pp. 395-401. 2010.

MAHMOUD, M.R.; EL-ABHAR, H.S. & SALEH, S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.79, pp. 1-11. 2002.

MALLIA, M.B.; SUBRAMANIAN, S.; BANERJEE, S.; SARMA, H.D; VENKATESH, M. Evaluation of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ complex of 2-methyl-5-nitroimidazole as an agent for targeting tumor hypoxia. **Bioorg. Med. Chem.** 2006. 14, p. 7666–7670.

MANNECK, T.; HAGGENMULLER, Y. & KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult. **Parasitology**, Vol.137, pp. 85-98. 2010.

MANNECK, T.; BRAISSANT, O.; ELLIS, W. & KEISER J. *Schistosoma mansoni*: antischistosomal activity of the four optical isomers and the two racemates of mefloquine on schistosomula and adult worms *in vitro* and *in vivo*. **Experimental Parasitology**, Vol.127, pp. 260-269. 2011.

MARQUES, M.E.T.; COSTA, J.P.C. **Jaborandi** (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1994. p.4.

MEEKER, T. C.; SIEGEL, M. S.; SHIOTA, F. M.; CROWLEY, J. J.; MCGUFFIN, R. W. **Toxicity** of amphotericin B, miconazole and ketoconazole to human granulocyte progenitor cells *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, p. 169–71. 1983.

MELO, A. L.; BARCELLOS, N. M. S.; DEMICHELI, C.; FREZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International journal of pharmaceutics**, v. 255, p. 227–230. 2003.

MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

MOHAMED, A.M.; METWALLY, N.M.; MAHMOUD, S.S. Sativa seeds against *Schistosoma mansoni* different stages, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.100, pp. 205-211.2005.

MOLGAARD,P.; NIELSEN, S.B.; RASMUSSEN, D.E.; DRUMMOND, R.B.; MAKAZA, N.; & ANDREASSEN, J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 74, pp. 257-264.2001.

MONTIANI-FERREIA, F. Oftalmologia. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAZ, J. L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. v. 1, p. 1092-1104.

MONTERO, R; OSTROSKY, P. Genotoxic activity of Praziquantel. **Mutation Research**. V. 387, pp123–139.1997.

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

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

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: *Current Topics in Tropical Medicine*; Rodriguez-Morales, A.J. Ed.; Intech: Rijeka, pp. 333-358. 2012.

MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L.F.; BITTENCOURT, C.R.; BEMQUERER, M.P.; LEITE, J.R.; KATO, M.J.; NAKANO, E. In vitro Synergistic interaction Between Amide Piplartine and antimicrobial Peptide

Dermaseptin 01 Against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**. 19,1-9. 2012

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C. T.; LUCA JR. L. A.; RENZI, A; MENANI, J. V. Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 429-434. 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55. 1983.

MOSTAFA, O.M.; EID, R.A. & ADLY, M.A. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**. 2011.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16(1), p. 61-66. 2006.

NARE, B.; SMITH, J.M. & PRICHARD, R.K. Differential effects of oltipraz and its oxy analogue on the viability of *Schistosoma mansoni* and the activity of glutathione S transferase. **Biochemical Pharmacology**, Vol.42, pp. 1287-1292. 1991.

NASCIMENTO G.G.F, LUCATELLI J, FREITAS P.C, SILVA G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol** 31: 247-256. 2000.

NASCIMENTO P.F.C, NASCIMENTO A.C, RODRIGUES C.S, ANTONIOLLI A.A, SANTOS P.O, BARBOSA JUNIOR A.M, TRINDADE R.C. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn** 17: 108-113. 2007.

NAVICKIENE, H.M.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.D.; YOUNG, M.C.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 55, 621-626. 2000.

NAVICKIENE H.M.D, BOLZANI V.D, KATO M.J, PEREIRA A.M.S, BERTONI B.W, et al. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. 14: 281-284.2003.

NDAMBA, J.; NYAZEMA, N.; MAKAZA, N.; ANDERSON, C. & KAONDERA, K.C Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.42, pp. 125-132. 1994.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Vol.70, pp. 461-477. 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. & SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Vol.66, pp. 1022-1037.2003.

OGBOLI, A. Medicinal application of *Vernonia amygdalina* del leaf extracts in the treatment of schistosomiasis in mice. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, Vol.4, pp. 73–75. 2000.

OLENDER D.; ŻWAWIAK, J.; LUKIANCHUK, V.; LESYK, R.; KROPACZ, A.; FOJUTOWSKI, A.; ZAPRUTKO, L. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. **Eur. J. Med. Chem.**, 2009. 44, p.645-652.

OLIVEIRA, A.; LONGHI, J.; ANDRADE, C.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M. A. Normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n. 2. 2006.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005**. Genebra, 2002. p.66.

OXHOLM, P.; PRAUSE, J. U.; SCHIØDT, M. Rational drug therapy recommendations for the treatment of patients with Sjögren's syndrome. **Drugs**, v. 56, p. 345-353. 1998.

PARKIN, A. et al., *CrystEngComm* 9. 8 ,648–652. **2007**.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.M.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E. & BOLL, P.M. **Phytochemistry of the genus *Piper***. *Phytochemistry*, Vol.46, pp. 597–673. 1997.

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

PAIVA, P. **Extrato de Jaborandi**. [São Paulo]. 2008. Disponível em: <http://www.peterpaiva.com.br/extratos/extrato_jaborandi/extrato_jaborandi.php>. Acesso em: 12 set. 2008.

PAPPANO, A. J. Drogas ativadoras dos receptores colinérgicos e inibidores da colinesterase. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 79-90.

PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; MELLO, R. T.; PILÓ-VELOSO, D.; OLIVEIRA, M. C.; KUSEL, J. R.; NELSON, D. L. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica**. v. 108, p. 249–255. 2008.

PENIDO, M. L. O.; NELSON, D. L.; VIERA, L. Q.; WATSON, D. G.; KUSEL J. R. Metabolism by *Schistosoma mansoni* of a new schistosomicide: 2-[(1-methylpropyl)-amino]-1-octanesulphuric acid. **Parasitology**, v. 111, p. 177–185. 1995.

PEREIRA, A.C.; MAGALHAES, L.G.; GONCALVES, U.O.; LUZ, P.P.; MORAES, A.C.; RODRIGUES, V.; DA MATTA GUEDES, P.M.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARA, N.P. & E SILVA, M.L.

Schistosomicidal and trypanocidal structure-activityrelationships for (• })-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. *Phytochemistry*, Vol.72, pp. 1424-1430. 2011.

PHILIPS, M. A; STANLEY JR, S. L. Quimioterapia das infecções por protozoários. In: BRUNTON, L. L.(Ed.) GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2006. p. 941-961.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a crop. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p.49-58. 1997.

PRASAD, A. K.; KUMAR, V.; ARYA, P.; KUMAR, S.; DABUR, R.; SINGH, N.; CHHILLAR, A. K.; SHARMA, G.; GHOSH, B.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E. & PARMAR, V. S.. Investigations toward new lead compounds from medicinally important plants. **Pure and Applied Chemistry**, Vol.77, pp. 25-40. 2005.

PUGH, R. N. H., and C. H. TEESDALE. Synergy of concurrent low dose oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. **Br. Med. J.**287:877–878. 1983.

RAMAKRISHNAN, R.; JUSKO, W. J. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. **Inter. Immunophar.**, v. 1, n. 12,2001.

RAMALHO-PINTO, F.J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R.E.; MOTA-SANTOS, T.A.; FIGUEIREDO, E.A. & PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. **Experimental Parasitology**, Vol.36, pp. 360-372. 1974.

RAMIREZ, B.; BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M.A. & NWAKA, S .Schistosomes: Challenges in compound screening. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Vol.2, pp. 53-61. 2007.

REICH, M.R. & FENWICK, A. *Schistosoma haematobium*. **The New England Journal of Medicine**, Vol.344, pp. 1170. 2001.

RATHORE, D.; MCCUTCHAN, T.F.; SULLIVAN, M.; KUMAR, S. Antimalarial drugs:current status and new developments. **Expert Opin. Investig. Drugs**, Vol. 14, pp. 871-883.2005.

RENZI, A.; COLOMBARI, E.; MATTOS FILHO, T. R.; SILVEIRA, J. E. N.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; DE LUCA JR., L. A.; DERÓBIO, J. G.; MENANI, J. V. Involvement of central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats, **Journal Dental Research**, v. 72, p. 1481–1484. 1993.

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

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Ed. Premier, 1997. p.163-208.

ROSENTAL, P. J.; GOLDSMITH, R. S. Farmacologia clínica dos anti-helmínticos. In: KATZUNG, B.G. (Ed). **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.741-750.

SABÁ, R. T; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.106-109. 2002.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1987. p.799-807.

SANDERSON, L.; BARTLETT, A. & WHITFIELD, P.J. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**, Vol.76, pp. 241–247. 2002.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n. 2, p. 115 – 137. 2004.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2. 2004.

SARVEL, A.K.; KUSEL, J.R.; ARAUJO, N.; COELHO, P.M.Z. & KATZ, N. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Vol.101, Suppl. I, pp. 289-292. 2006.

SAWAYA, A. C. H. F.; ABREU, I. N.; ANDREAZZA, N. L.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. HPLC-ESI MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. **Molecules**. v. 13, p.1518-1529. 2008.

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

SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149 – 1166. 2005.

SHARMA, D.; NARASHIMAN, B.; KUMAR, P.; JUDGE, V.; NARANG, R.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J. Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 2347-2353. 2009.

SHEIR, Z.; NASR, A.A.; MASSOUD, A.; SALAMA, O.; BADRA, G.A.; EL-SHENNAWY, H.; HASSAN, N. &HAMMAD, S.M. A safe, effective, herbal

antischistosomal therapy derived from myrrh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vol.65, pp. 700- 704. 2001.

SHIM,J. and MACKERELL JR A.D. **Medchemomm**. 2(5): 356–370. 2011.

SHUHUA, X., CATTO, B.A.,. *In vitro* and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p. 1557-1562. 1989.

SILVA,R.V; HOSANA, M.; NAVICKIENE,D.; KATO,M.J; BOLZANI,V.S; MÉDA,C.I;YOUNG,M.C.M.; FURLAN,M. Antifungal amides from Piper arboreum and Piper tuberculatum. **Phytochemistry** . V.59,pp 521–527.2002.

SILVESTRIS, N.; MAIELLO, E.; DE VITA, F.; CINIERI, S.; SANTINI, D.; RUSSO, A.;TOMMASI, S.; AZZARITI, A.; NUMICO, G.; PISCONTI, S.; PETRIELLA, D.; LORUSSO,V.; MILLAKU, A.; COLUCCI, G. Update on capecitabine alone and in combination regimens in colorectal cancer patients. **Cancer Treat. Rev.**,36 (Suppl 3), S46-S55. 2010.

SIMONETTI N, D'AURIA F. D.; STRIPPOLI, V. Short term contact activity of miconazole sulfosalicylate and econazole sulfosalicylate. **European Bulletin Drug Research**, v. 2(Sup. 1), p. 123–128. 1993.

SIMONETTI, G.; BAFFA, S.; SIMONETTI, N. Contact imidazole activity against resistant bacteria and fungi. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 389–393. 2001.

SKELLY, P.J. & ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface, *Advances in Parasitology*, Vol.63, pp. 185-284. 2006.

SKORUPA, L. A. Espécies de Pilocarpus Vahl (Rutaceae) da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, v. 30, p.59 – 70. 2000.

SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. **Parasitology**, Vol.55, pp. 695- 700. 1965.

SMOUT, M.J.; KOTZE, A.C.; MCCARTHY, J.S. & LOUKAS, A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. **PLoS Neglected Tropical Disease**, Vol.4, pp. e885. 2010.

SPACKMAN, M.A., BYROM, P.G. *Chem. Phys. Lett.* 267 (3–4) 215–220. 1997

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

TAGBOTO, S. & TOWNSON, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. **Advances in Parasitology**, Vol.50, pp. 199-295.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Activation of α 2-adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. **Neuroscience Letters**, v. 450, p. 225–228. 2009.

TAMMES, P. M. L. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Nether. J. Plant Pathol.*, v. 70, n. 2, p. 73-80, 1964.

TAYLOR S. E.; AL-HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Texas Dental Journal**, v.113, p.10-12, 1996.

UTZINGER J, XIAO, S.H.; TANNER, M. & KEISER, J. Artemisinins for schistosomiasis and beyond. **Current Opinion in Investigational Drugs**, Vol.8, pp. 105-116. 2007.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M. & SINGER, B.H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol.47, pp. 1487-1495. 2003.

UTZINGER, J.; XIAO, S. N'GORAN, E.K.; BERGQUIST, R. & TANNER, M The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **International Journal for Parasitology**, Vol.31, pp. 1549-1562. 2001.

VAN DER LINDEN, P.W. & DEELDER, A.M. *Schistosoma mansoni*: a diamidinophenylindole probe for *in vitro* death of schistosomula. **Experimental Parasitology**, Vol.57, pp.125-131. 1984.

VAN DER WERF, M.J.; DE VLAS, S.J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C.W.; NAGELKERKE, N.J.; HABBEMA, J.D.& ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, Vol.86, pp. 125-139. 2003.

VAN HELLEMONT, J.J.; RETRA, K.; BROUWERS, J.F.; VAN BALKOM, B.W.; YAZDANBAKHSI, M.; SHOEMAKER, C.B. & TIELENS, A.G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, Vol.36, pp. 691-699. 2006.

VAZ DE LIMA, L.A.C. AND A.S. NASCIMENTO. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2013 , 59, 296-303.

VEGEFLORA, Plano de manejo florestal comunitário: *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew. Parnaíba, **VEGEFLORA**, 71 p. 2010.

VENKATAKRISHNAN, K.; MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. **Clinical pharmacokinetics**, v. 38(2), p. 111-80. 2000.

VERAS L. M. C., CUNHA, V. R. R., LIMA, F. C. D. A., GUIMARÃES, M. A., VIEIRA, M. M., CAMPELO, Y. D. M., SAKAI, V. Y., LIMA, D. F., JUNIOR, P. S. C., ELLENA J.

A., SILVA, P. R. P., VASCONCELOS, L. C., GODEJOHANN, M., PETRILLI, H. M., CONSTANTINO, V.R. L., MASCARENHAS, Y. P., LEITE, J. R. S. A. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLOS ONE**. Vol.8, p.1-11.2013.

VERAS L.M, GUIMARÃES M.A, CAMPELO Y.D, VIEIRA M.M, NASCIMENTO C, LIMA D, VASCONCELOS L, NAKANO E, KUCKELHAUS S, BATISTA M.C, LEITE J.R, MORAES J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Curr. Med. Chem.**2051-2058, 2012.

VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.67-79,

VIVINO, F. B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; LEVEQUE, F. G.; SALISBURY, P. L.; TRAN-JOHNSON, T. K.; MUSCOPLAT, C. C.; TRIVEDI, M.; GOLDLUST, B.; GALLAGHER, S. C. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 2, p. 174-181. 1999.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M. Epiisopiloturin, ein Neues *Pilocarpus*-Alkaloid. **Archiv der Pharmazie**, v. 311, p. 927-935. 1978.

WILLIAM, S.; BOTROS, S.; ISMAIL, M.; FARGHALLY, A.; DAY, T.A.; BENNETT, J.L. Praziquantel –induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel resistant infections. **Parasitology**.122,p.63-66. 2001.

WISEMAN, L.R.; FAULDS, D. Oral pilocarpine: A review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia, **Drugs**, v. 49, p. 143–155. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Partners for parasite control : prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**. Disponível em

http://www.who.int/wormcontrol/documents/joint_statements/en/ppc_unicef_finalreport.pdf > Acesso em 18 out.2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global atlas on schistosomiasis**. Disponível em : <http://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology>. Acesso em 26 abr. 2013.

WYNN, R. L. Oral pilocarpine (salagen): a recently approved salivary stimulant. **General dentistry**, v. 44(1), p. 29-30, 1996.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VANNERSTROM, J. L.; TANNER, M. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1440-1445. 2007.

XIAO, S.; TANNER, M.; N'GORAN, E.K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; CHEN, M. & ZHENG, J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Tropica**, Vol.82, pp. 175- 181.2002.

XIAO, S.H.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J. & TANNER, M. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. **Acta Tropica**, Vol.75, pp. 341–348. 2000.

XIAO, S. H., J. Q. YOU, J. Y. MEI, H. F. GUO, P. Y. JIAO, and M. TANNER. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. **Parasitol. Int.**49:25–30. 2000.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VANNERSTROM, J. L.; TANNER, M. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1440-1445. 2007.

YOLLES, T. K.; MOORE, D. V.; DE GUISTI, D. L.; RIPSOM, C. A.; MELENEY, H. E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **Journal Parasitology**, v. 33, p. 419-426. 1947.

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

ZAGO, J. A. A., USHIMARU, P. I., BARBOSA, L. N., JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(4): 828-833. 2009.

ZHAO, L.; WIENTJES, M.G.; AU, J.L. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. **Clin. Cancer Res.**, V. 10, 7994-8004. 2004.



CAPÍTULO II

EFEITOS SINÉRGICOS DE COMBINAÇÕES *IN VITRO* DE PIPLARTINA, EPIISOPILOTURINA E PRAZIQUANTEL CONTRA *Schistosoma mansoni*

(Artigo aceito na revista **Biomedicine & Pharmacotherapy**.)

Impact factor: 2.75

Qualis: B1 - Biotecnologia

EFEITOS SINÉRGICOS DE COMBINAÇÕES *IN VITRO* DE PIPLARTINA, EPIISOPILOTURINA E PRAZIQUANTEL CONTRA *Schistosoma mansoni*

Yuri Dias Macedo Campelo^{1,2}, Ana Carolina Mafud³, Leiz Maria Costa Vêras¹, Maria Adelaide Guimarães^{1,4}, Lydia F. Yamaguchi⁵, David Fernandes Lima^{1,6}, Daniel Dias

Rufino Arcanjo¹, Massuo J. Kato⁵, Ronaldo Z. Mendonça⁷, Pedro Luiz Silva Pinto⁸, Yvonne Primerano Mascarenhas³, Marcos P. N. Silva⁹, Josué de Moraes⁹, Peter Eaton^{1,10}, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{1,11*}

¹Centro de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, 64202020, Brasil

²Instituto de Ensino Superior do Vale do Parnaíba, FAHESP / IESVAP, Parnaíba, PI, Brasil

³São Carlos Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

⁴Phytobios Nordeste LTDA, Grupo Centroflora, Parnaíba, PI, Brasil.

⁵Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

⁶Universidade Federal do Vale do São Francisco, Paulo Afonso, BA, Brasil.

⁷Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

⁸Enteroparasites Center, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

⁹Centro de Pesquisa de Doenças Negligenciadas, Faculdade de Ciências de Guarulhos, FACIG / UNIESP, Guarulhos, SP.

¹⁰UCIBIO / REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

¹¹Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil;

Autor Correspondente: Prof. José Roberto de Souza de Almeida Leite, PhD. Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brasil. CEP 70910-900. Número de telefone: +55 3107 1891. E-mails: jrsaleite@gmail.com; Jrleite@pq.cnpq.br.

Resumo

A esquistossomose é um problema de saúde mundial, e o praziquantel é o único fármaco atualmente utilizado para o tratamento. Há alguma evidência de que a

monoterapia extensiva de praziquantel pode estar causando resistência do parasita ao medicamento. A fim de encontrar tratamentos alternativos, foram avaliados os efeitos da combinação de epiisopiloturina (EPI), pipartina (PPT) e praziquantel (PZQ). A análise de similaridade destes compostos foi realizada utilizando estruturas moleculares otimizadas para comparar a forma e a modelação de carga de combinações entre PZQ e EPI ou PPT. A partir destes dados, foi realizada a associação in vitro de PZQ-PPT, PZQ-EPI e EPI-PPT e avaliada a atividade destas combinações contra o *Schistosoma mansoni*. Os resultados mostraram atividade sinérgica com um índice de combinação (IC) de 0,42 para o tratamento com PZQ-PPT. As combinações PZQ-EPI e EPI-PPT também apresentaram efeitos sinérgicos, com valores de IC de 0,86 e 0,61, respectivamente. As alterações superficiais no tegumento de esquistossomas adultos após os tratamentos foram observadas por microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, a associação de EPI-PPT diminuiu a citotoxicidade quando comparada com ambos os compostos isolados em três linhas diferentes de células de mamífero. Assim, combinações sinérgicas de PZQ-PPT, PZQ-EPI e EPI-PPT criam a possibilidade de doses reduzidas para serem utilizadas contra o *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: Alcaloide; Combinação de fármacos; Piplartina; Epiisopiloturina; Praziquantel; Toxicidade; *Pilocarpus microphyllus*; *Schistosoma mansoni*.

Destaques

- As combinações de PZQ, EPI e PPT são capazes de induzir atividade sinérgica contra *Schistosoma mansoni*
- As combinações sinérgicas de PZQ, EPI e PPT induziram alterações de superfície no tegumento de esquistossomas adultos após os tratamentos
- Foi observada uma diminuição do efeito citotóxico das combinações sinérgicas em células de mamíferos

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada que ocorre amplamente em regiões tropicais e subtropicais, e é causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, sendo a espécie *Schistosoma mansoni* a principal causa dessa doença em humanos [1]. Os principais sintomas desta doença estão relacionados com a produção de

ovos que podem ser encontrados principalmente no fígado e baço. A resposta inflamatória mediada pelo sistema imunológico contra estes ovos é o principal fator que causa danos ao hospedeiro, e pode levar a uma condição de saúde grave e, eventualmente, à morte [1]. Esta parasitose é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anuais, ficando atrás apenas da malária [2,3].

O único fármaco utilizado no tratamento e controle da esquistossomose é o praziquantel (PZQ). No entanto, após décadas de monoterapia, evidência de resistência do parasita ao medicamento foi observada [4], com isto há uma necessidade urgente de descobrir novos compostos ou terapias alternativas contra a esquistossomose, sendo a combinações de fármacos uma alternativa no tratamento desta doença [4,5].

Os produtos naturais têm sido considerados como uma fonte de terapias alternativas contra várias doenças [6]. Compostos de extratos de plantas são candidatos promissores no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças microbianas e parasitárias [7,8]. Neste sentido, a epiisopiloturina (EPI) (3- [hidroxi (fenil) metil] -4 - [(3-metil-1H-imidazol-5-il) -metil] -tetra-hidrofuran-2-ona), um alcalóide encontrado nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) [9-11], apresentou *in vitro* atividade anti-helmíntica na forma isolada ou encapsulado em lipossomas [12,13]. Do mesmo modo, a piplartina (PPT) (5,6-di-hidro-1 [1-oxo-3- (3,4,5-trimetoxifenil) -trans-2-propenil] -2 (1H) piridina), uma amida encontrada em várias espécies de *Piper* (*Piperaceae*) [14,15], promove *in vitro* atividade contra formas jovens e adultos de *S. mansoni* [16,17].

As combinações de fármacos como uma abordagem alternativa utilizada na terapia de várias doenças têm demonstrado importância clínica devido ao aumento na eficácia dos tratamentos, bem como diminuições na toxicidade e resistência aos fármacos [18]. As interações entre fármacos são comumente classificadas como sinérgicas, aditivas ou antagonistas. O sinergismo pode ocorrer com drogas que têm o mesmo mecanismo de ação (um efeito aditivo), que agem por modos diferentes (soma) ou que agem em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). Para definir qual tipo de associação ocorre, os estudos de interação entre fármacos comumente são feitos a partir da geração de isobogramas e a determinação do índice de combinação (IC) [6,19,20].

O objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antihelmíntica de combinações em pares de PZQ, EPI e PPT contra vermes adultos e jovens de *Schistosoma mansoni*, com base na relação entre as características moleculares e químicas da molécula, a investigação de alterações morfológicas no parasita e a avaliação da citotoxicidade contra células hospedeiras de mamíferos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise de Similaridade Baseada em Ligantes Ativos

O cálculo de similaridade é um método computacionalmente acessível para identificar compostos com propriedades semelhantes às de um composto ativo, com baseado em certo número de parâmetros, incluindo as impressões digitais químicas, propriedades físico-químicas, bem como características de 2D e 3D [21-23]. MolShaCS [24] é um programa desenvolvido em C++ para comparar pequenas moléculas baseado em sua forma e polaridade. MolShaCS usa descritores implementados no programa Gaussian, para forma molecular e de distribuição de carga entre as moléculas para orientar uma otimização sobreposição e para calcular índices de similaridade, utilizando o campo de força semi-empírico AMBER FF+ [25].

As cargas atômicas foram calculados utilizando o método AM1, tal como implementado no programa Antechamber [26], incluindo desolvatação. Para avaliar a similaridade da superfície de contato, os cálculos foram realizados através da fixação das coordenadas do PZQ e da otimização da geometria das demais moléculas para aumentar a correlação entre elas. Para esta operação foram utilizados como variáveis os raios de Van der Waals (VdW), potencial eletrostático (Q) e ambos simultaneamente. Os demais parâmetros estruturais calculados foram: área de superfície de Van der Waals; Os mapas de potencial eletrostático molecular (MEP), o potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e a área de superfície polar (PSA), utilizando o pacote VEGA [27,28].

2.2 Avaliação da características de semelhança entre as moléculas.

As características *in silico* de EPI e PPT foram calculados utilizando o programa OSIRIS property explorer [29] para comparar com as características do PZQ. Os dados foram gerados on-line no programa Osiris, acessado pelo link (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> acessado em 1 de outubro de 2014) e representado pela semelhança e características entre estas moléculas. A densidade de fármaco foi calculada com base numa equação que resume os valores de densidade dos fragmentos presentes na molécula sob investigação. Os fragmentos foram identificados a partir de uma lista de 5300 fragmentos de infra estrutura distintas com escores de toxicidade associada [30]. Os resultados obtidos no OSIRIS foram comparados com dados de LogP calculados pelo applet ALOGPS [31] (VCCLAB, Laboratório de Química Computacional Virtual, <http://www.vcclab.org/> acessado em 01 de outubro de 2014). A Figura 1 mostra as estruturas moleculares de EPI, PPT e PZQ.

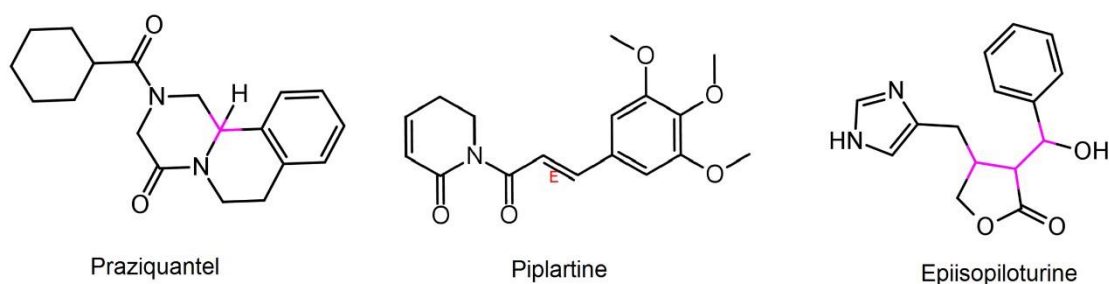


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos estudados, com centros quirais em rosa. A: Praziquantel, B: Piplartina e C: Epiisopiloturina

2.3 Moléculas.

O EPI foi isolado da produção de biomassa de pilocarpina por folhas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), de acordo com o método descrito anteriormente [32]. O PPT foi isolado de um extrato de raízes de *Piper tuberculatum* (Piperaceae), que foi submetido a recristalização com metanol para obtenção do sal puro [33]. A PZQ foi adquirida da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Preparou-se uma solução de reserva (2 mM) para todas as substâncias utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As plantas foram coletadas e transportadas para fins de pesquisa de acordo com a licença ambiental emitida pelo IBAMA, número 5763956.

2.4 Animais e Parasitas.

A linhagem BH de *Schistosoma mansoni* foi mantida em caramujos de *Biomphalaria glabrata* e hamsters de *Mesocricetus auratus* no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil), de acordo com procedimentos padronizados. Métodos detalhados para a infecção de moluscos e hamsters, bem como para a recuperação de parasitas, foram descritos anteriormente [34]. Resumidamente, os moluscos hospedeiros infectados foram expostos à luz durante aproximadamente 3 horas e subsequentemente, as cercárias de *S. mansoni* foram colhidas. Hamsters (idade 3 semanas, peso 25 g) foram infectados subcutaneamente com 150 cercárias e, 49 dias após a infecção, amostras adultas de *S. mansoni* foram recuperadas de cada hamster por perfusão com meio RPMI 1640 (Invitrogen, São Paulo) e heparina. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Revisão Institucional do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil, número de aprovação 405/15). Todos os animais foram manuseados em estrita conformidade com as boas práticas animais conforme definido pelo Comitê de Ética em Uso Animal.

2.5 *Schistosomas* adultos.

As preparações e cultura de *Schistosoma* foram realizadas conforme descrito anteriormente [35,36]. Resumidamente, os hamsters foram eutanasiados 49 dias após a infecção para a recuperação de esquistossomas adultos. Em seguida, foram lavados pares de vermes adultos (machos e fêmeas) frescos e colocados numa placa de cultura de 24 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, Brasil) e 200 µg / mL de estreptomicina, 200 UI / mL de penicilina (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) a 37 ° C numa atmosfera de CO₂ a 5%. Os esquistossomas adultos foram mantidos continuamente no meio (com ou sem drogas) durante 72 h, conforme descrito abaixo.

2.6 Ensaios de combinações de fármacos.

A sobrevivência de *S. mansoni* de 49 dias de idade foi avaliada *in vitro* após a incubação com diferentes concentrações de PPT, EPI e PZQ adicionados individualmente ou em combinação [37]. Inicialmente, a concentração letal (LC100) que mata todos os esquistossomos dentro de 72 horas de exposição *in vitro* ao fármaco e as concentrações de efeito mediano (LC50) foram avaliadas separadamente para PPT, EPI e PZQ. Para os estudos de interação, os compostos foram adicionados simultaneamente em doses fixas com base nos valores previamente determinados de LC50. Os vermes foram colocados em meio RPMI 1640 isolado ou com 0,5% de DMSO, como controle negativo; O PZQ foi incubado com parasitas durante 72 h a 37°C e 5% de CO₂, como controle positivo. As placas de cultura foram monitorizadas com um microscópio invertido. A morte do parasita foi avaliada qualitativamente com ênfase nas alterações na atividade motora do verme e / ou alterações tegumentares [38,39]. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e foram repetidas pelo menos três vezes.

2.7. Análise estatística.

Os valores de LC50 foram calculados com o software GraphPad Prism (versão 5.0). O Índice de Combinação (IC) e as parcelas de isoblograma foram calculadas utilizando o pacote de software CompuSyn. O sinergismo é definido como um efeito aditivo mais do que o esperado. Neste método, um valor de IC igual a 1,0 indica um efeito aditivo, um valor IC inferior a 1,0 indica sinergismo e um valor superior a 1,0 indica antagonismo [40].

2.8. Estudos de microscopia.

Para observar alterações morfológicas no tegumento do parasita, o *S. mansoni* adulto foi monitorado usando um microscópio confocal de varredura a laser seguindo procedimento padrão previamente descrito [37]. Resumidamente, após o período de tratamento com fármaco (72 h) ou após a morte, os parasitas foram fixados numa solução de formalina-ácido acético-álcool (FAA) e analisados utilizando um microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Standort Göttingen, Vertrieb, Alemanha) a 488 nm de excitação e 505 nm de emissão [37]. A solução FAA consiste numa mistura de formaldeído, ácido acético, etanol aquoso a 95% e água destilada (9/2/30/59, v / v). Não foi necessário fluoróforo para capturar

imagens, uma vez que os esquistossomos são auto fluorescentes e que a fluorescência é aumentada quando os parasitas estão na solução FAA. [7,13,37,38]. A fim de resolver mais detalhes de alterações no tegumento, utilizou - se microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para SEM, os parasitas foram inicialmente fixados na solução FAA. Em seguida, a FAA foi removida e substituída duas vezes por um fixador secundário, tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão de cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,3, seguido de incubação durante 2 h com agitação suave. O tampão de cacodilato de sódio foi então substituído duas vezes com água ultrapura. As amostras foram então secas ao ar a partir de água sobre fita adesiva de carbono, revestidas com ouro-paládio para condutividade, e formadas por imagem no SEM. O SEM foi uma quantidade de FEI 400 SEM, operando em modo de elétron secundário. As amostras foram fotografadas com uma distância de trabalho de 10-15 mm e uma tensão de aceleração de 15 kV.

2.9. Avaliação citotóxica.

Os testes de citotoxicidade utilizaram a estirpe celular VERO que se originou a partir de rim de macaco, células MDCK de rim canino e células L929 originárias de fibroblastos de camundongo. Os ensaios foram realizados utilizando o método de coloração com violeta cristal tal como descrito anteriormente [41]. Nas experiências, as células foram colocadas para crescer em placas de cultura de 96 poços (inoculação inicial de 2×10^5 células / mL). Após 24 horas, com camadas de células confluentes, os compostos foram adicionados e depois divididos em quatro grupos, seguido por uma diluição em série dupla. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C numa atmosfera de CO_2 a 5%. Posteriormente, as amostras foram coloridas com 100 μL de solução cristal violeta (0,2%) durante 15 minutos e lavadas com água. Neste processo, as células não aderidas (com falta de viabilidade) foram removidas. Após secagem à temperatura ambiente, as placas foram observadas no microscópio invertido. Todos os poços de teste foram então fotografados utilizando uma lente objetiva 40x, e a imagem completa da célula foi focada e centrada. Depois disso, foi aplicada uma ampliação de 400x; focalizando-se na parte central do fundo de cada poço e a fotomicrografia foi tirada.

Para avaliação quantitativa, foram utilizadas células Vero. Neste caso, foi adicionado 99% de etanol nas placas de cultura preparadas como acima

mencionado e a absorbância foi medida a 595 nm num leitor de microplacas de acordo com um procedimento previamente descrito [42].

3. RESULTADOS

3.1 Similaridade em pares.

Os pares considerados foram PZQ-PPT, PZQ-EPI e PPT-EPI. PPT e EPI as quais pertencem a uma classe molecular diferente daquela de PZQ. Para investigar as diferenças entre eles, foi realizada uma análise estrutural para calcular a área de superfície vdW (vdW), a superfície do potencial eletrostático molecular (MEP), a superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e a área de superfície polar (PSA), utilizando o pacote VEGA (Mostrados na Tabela 1 e S1). Os valores LogP de PZQ, PPT e EPI foram preditos utilizando o método ChemAxon. A similaridade global de PPT e EPI com PZQ foi calculada e os resultados para os dois compostos foram de 81% e 74% de similaridade, respectivamente. Com PPT como o composto fixo, PZQ e EPI mostraram valores de 90% e 88% de similaridade respectivamente. Quando o EPI foi fixado, os resultados mostraram valores de 74% para PZQ e 88% para PPT. A superposição entre PZQ, PPT e EPI é mostrada na Figura 2. Apesar das diferenças significativas na área de superfície, a diferença mais importante entre PZQ e PPT diz respeito à área de superfície polarizada topológica (TPSA), que é maior em PPT, enquanto suas superfícies hidrofóbicas são proporcionalmente iguais, evidenciando que eles poderiam potencialmente ser acomodados no mesmo local de destino.

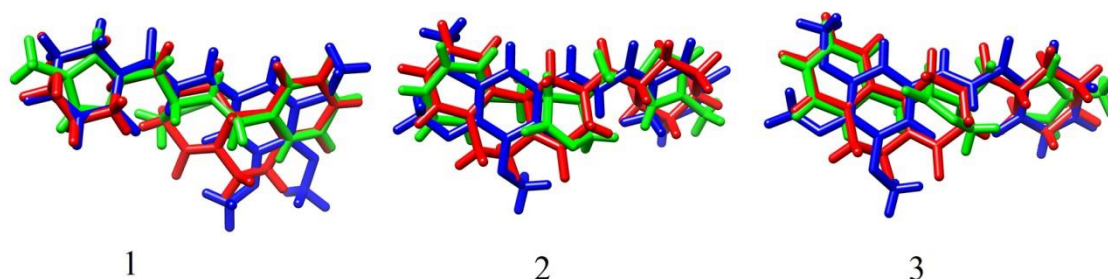


Figura 2. Superposição entre os três compostos, relacionando o raio vdW 1, o potencial eletrostático 2 e o potencial combinatório vdW / eletrostático. PZQ mostra em vermelho; PPT em azul; EPI em verde.

3.2 Avaliação de semelhança entre as moléculas.

Os fragmentos presentes nas moléculas foram comparados com uma biblioteca de fragmentos de subestrutura para determinar as características de toxicidade para cada uma das três moléculas estudadas [43]. A característica de similaridade de fármaco pode prever qualitativamente a biodisponibilidade de um composto e foi calculada através da combinação de semelhança com fármaco, LogP, solubilidade prevista e peso molecular. Conforme ilustrado na Tabela 1 e S1, o EPI e o PPT foram preditos que tinham similaridade de fármaco entre si, e ambos eram superiores ao PZQ. Isto pode ser compreendido com base na maior flexibilidade de EPI e PPT do que de PZQ. PZQ é considerado um fármaco seguro, no entanto, o PZQ em doses muito elevadas (ratos albinos que receberam 1500 mg / kg por semana durante 6 semanas) apresentou hepatotoxicidade [44]. In vitro, o PZQ foi citotóxico em concentrações muito elevadas (30 a 120 µg / mL) [45].

Tabela 1. Avaliação de Similaridade e Semelhança de Drogas.

		PZQ	PPT	EPI
VdW surface area (Probe radius: 1.40)		523.8 Å ² (ds=12.9Å)	565.2 Å ² (ds=13.4Å)	457.9 Å ² (ds=12.1Å)
Molecular electrostatic potential - MEP surface		331.6 Å ² (ds=10.3Å)	344.9 Å ² (ds=10.5Å)	310.4 Å ² (ds=9.9Å)
Molecular Lipophilicity potential - MLP surface		541.9 Å ² (ds=13.1Å)	587.2 Å ² (ds=13.7Å)	468.3 Å ² (ds=12.2Å)
Polar Surface area - PSA surface		62.8 Å ² (apolar=461.0Å ²)	94.6 Å ² (apolar=470.6Å ²)	124.4 Å ² (apolar=333.5Å ²)
Similarity (%)	VdW	100	81	74
	Electrostatic	100	28.1	32.5
	VdW + Elect	100	68.9	67.3
DrugLikeness		-0.094	3.8	4.05
LogP		2.62	2.49	1.22
TPSA		40.62	65.07	64.35

(TPSA: Topological Polar Surface Area, ds: dot size; VdW: Van der Waals radii)			

3.3. Isolamento e Caracterização.

A extração de 10 g de extrato bruto de *P. microphyllus* produziu cerca de 3 g de EPI puro. O EPI isolado foi identificado por comparação com o EPI padrão usando HPLC de cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, a detecção de um pico molecular de íon m/z de 287 Da em espectrometria de massa foi utilizado para confirmar a molécula de EPI [13,32]. Obteve-se PPT puro após subsequente cristalização de extratos de metanol a partir de raízes de *P. tuberculatum* e a molécula foi confirmada por comparação do tempo de retenção em HPLC com uma amostra padrão, além de espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear [33].

3.4. Ensaio de fármaco único contra *S. mansoni*.

As concentrações letais (LC100) de fármacos isolados que causam morte contra *S. mansoni* de 49 dias de idade dentro de 72 horas de exposição a drogas *in vitro* e as concentrações de efeito mediano (LC50) foram determinadas para PPT, EPI e o fármaco de referência PZQ. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Com base nos valores de LC50 e LC100, o PPT tem uma atividade consideravelmente mais elevada do que o EPI contra *S. mansoni*, reduzindo a motilidade e provocando morte em concentrações inferiores a 10 μM , enquanto EPI requer concentrações superiores a 500 μM . Por outro lado, PZQ mostrou eficácia em concentrações mais baixas, mostrando uma LC100 inferior a 3 μM . Os valores LC50 e LC100 foram mais tarde utilizados para a avaliação dos efeitos das combinações em pares de PPT, EPI e PZQ.

Tabela 2. Efeito esquistossomicida da amida piplartina (PPT), do alcalóide epiisopiloturina (EPI) e do fármaco de referência praziquantel (PZQ) contra o *Schistosoma mansoni* após 72 horas. Os valores representam a concentração letal encontrada para 50 ou 100% (LC50 e LC100)

Piplartina		Epiisopiloturina		Praziquantel	
LC ₅₀ (µM)	LC ₁₀₀ (µM)	LC ₅₀ (µM)	LC ₁₀₀ (µM)	LC ₅₀ (µM)	LC ₁₀₀ (µM)
7.87	9.45	611.61	698.83	1.26	2.96

3.5. Efeito das combinações PPT-EPI contra *S. mansoni*.

A Tabela 3 mostra os efeitos combinados in vitro da amida PPT com o alcaloide EPI contra o verme adulto *S. mansoni*. De acordo com estes resultados, o sinergismo entre os dois compostos foi observado em algumas das concentrações testadas. De fato, metade das concentrações testadas apresentou efeitos sinérgicos e metade dos efeitos não sinérgicos (ver Tabela S2, informação de suporte). Por exemplo, não se observou morte em vermes adultos de *S. mansoni* tratados com PPT (3B) de 1,98 µM sozinho ou EPI 3C de 305,80 µM sozinhos, enquanto a combinação destes dois compostos era mais eficiente do que as suas doses únicas, matando todos os vermes. Como esperado, foram observadas alterações tegumentares (ruptura do tubérculo, com retração e erosão severa, e colapso de tecido) em esquistossomas adultos quando foram combinados 1,98 µM de PPT e 305,8 µM de EPI (Figura 3D). Como mencionado anteriormente, essas doses individuais tiveram alguns efeitos na morfologia do tegumento (buracos no caso de PPT e mudanças na morfologia do tubérculo com EPI), mas os efeitos dos dois fármacos juntos foram consideravelmente maiores. As imagens na figura 6D e 6E, que mostram algumas áreas sem tubérculos visíveis (à esquerda da imagem). Os dados de SEM confirmam este resultado, mostrando alterações tegumentares brutas, que foram maiores nos vermes tratados com a combinação dos dois fármacos do que os tratados com os fármacos isolados (Figura 6H). A Figura 7A ilustra o efeito da dose de combinação utilizando um isoblograma. As combinações de PPT-EPI mostraram efeito sinérgico sobre *S. mansoni* adulto, com valores de IC inferiores a 1,0 (IC 0,61). Note-se que embora a Tabela 3 mostre apenas os resultados selecionados, muitas combinações diferentes de PPT e EPI foram testadas, e os resultados restantes estão incluídos na Tabela S2 (informações suplementares).

Tabela 3. Efeito da piplartina (PPT) e da epiisopiloturina (EPI) em adultos *Schistosoma mansoni* de 49 dias de idade após 72 horas.

Razão testada	Piplartina (vermes mortos) ^a	Epiisopiloturina (vermes mortos) ^a	Piplartina + Epiisopiloturina (Vermes mortos) ^a	CI*
0.25LC ₅₀ :LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	611.61 ^b (50%)	1.98 + 611.61 ^b (100%)	1.08
0.25LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	305.80 ^b (0%)	1.98 + 305.80 ^b (100%)	0.61
0.125LC ₅₀ :LC ₅₀	0.99 ^b (0%)	305.80 ^b (50%)	0.99 + 305.80 ^b (50%)	0.63

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinado (IC) menos que 1.0 indica sinergismo.

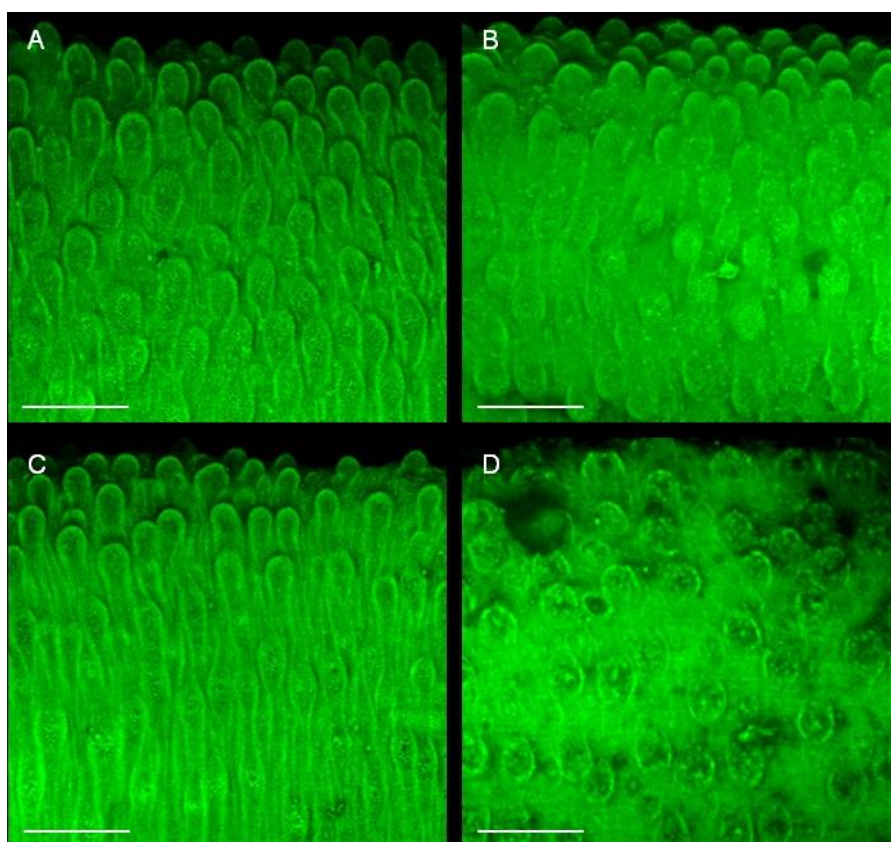


Figura 3. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com amida piplartina e alcalóide epiisopiloturina administrado individualmente e em combinações. Vermes machos adultos foram

fixados em solução de FAA e as imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal. (A) Controle negativo contendo RPMI 1640 com 0,5% de DMSO. (B): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 1,98 μM pipilartina sozinho. (C): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 305,8 μM epiisopiloturina. (D): Danos extensivos no tegumento observado no verme macho resultante de uma combinação de 1,98 μM pipilartina mais 305,8 μM epiisopiloturina (0.25LC50: 0.5LC50, respectivamente). Barras de escala 50 μM .

3.6. Efeito das combinações PPT-PZQ contra *S. mansoni*.

Alguns resultados que ilustram os efeitos na sobrevivência de vermes adultos de *S. mansoni* de exposição a PPT combinados com PZQ simultaneamente são mostrados na Tabela 4. A combinação de PPT com PZQ foi mais eficiente do que cada composto sozinho. A análise de IC mostrou uma atividade antiesquistossomica sinérgica de PPT e PZQ com valores de IC inferiores a 1,0 (Tabela 4). De fato, a quase todas as concentrações testadas, foram encontrados efeitos sinérgicos (ver Tabela S3, informação de apoio). Por exemplo, não se observou morte em vermes adultos de *S. mansoni* tratados com PPT de 1,98 μM (figura 4C) isoladamente, enquanto na mesma concentração foi observada diminuição da atividade motora e 100% dos parasitas morreram quando o PZQ foi combinado com o PPT em concentrações acima de 0,315 μM . Curiosamente, a combinação de 1,98 μM de PPT e 0,63 μM de PZQ matou 100% dos parasitas, embora estes compostos isolados não tivessem efeito observado nestas concentrações. Nos dados de CLSM, quando os dois compostos foram combinados a 0,63 e 198 μM , foram observados danos tegumentares extensivos ao longo da superfície do verme (Fig. 4D). Os danos incluíram ruptura de tubérculos, com encolhimento e erosão severa, e colapso de tecido. Nas imagens dos compostos isolados, foram observadas apenas pequenas alterações (aparência de furos). Os dados de SEM confirmam estes dados, com as alterações nos compostos individuais (Figura 6B e 6E), mostrando alterações relativamente pequenas. Este foi especialmente o caso do PZQ, como mencionado anteriormente, enquanto o PPT a 1,98 μM alterou a estrutura do tubérculo e levou à perda de espinhas. A combinação destes dois fármacos, no entanto, leva a grandes alterações na morfologia, com tubérculos mal visíveis, e encolhimento do tegumento (figura 6F). A sinergia entre os dois compostos foi também indicada nos isobogramas (Figura 7B). Note-se que embora a Tabela 4 mostre apenas os

resultados selecionados, muitas combinações diferentes de PPT e PZQ foram testadas, e os resultados restantes estão incluídos na tabela S3 (informações suplementares).

Tabela 4. Efeito da piplartina (PPT) e praziquantel (PZQ) em *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade após 72 horas.

Razão testada	Piplartina (vermes mortos) ^a	Praziquantel (vermes mortos) ^a	Piplartina + Praziquantel (vermes mortos) ^a	CI*
0.25LC ₅₀ :LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	1.98 ^b + 1.26 ^b (100%)	0.63
0.25LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	0.63 ^b (0%)	1.98 ^b + 0.63 ^b (100%)	0.42
0.25LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	0.315 ^b (0%)	1.98 ^b + 0.315 ^b (50%)	0.50

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinado (IC) menos que 1.0 indica sinergismo.

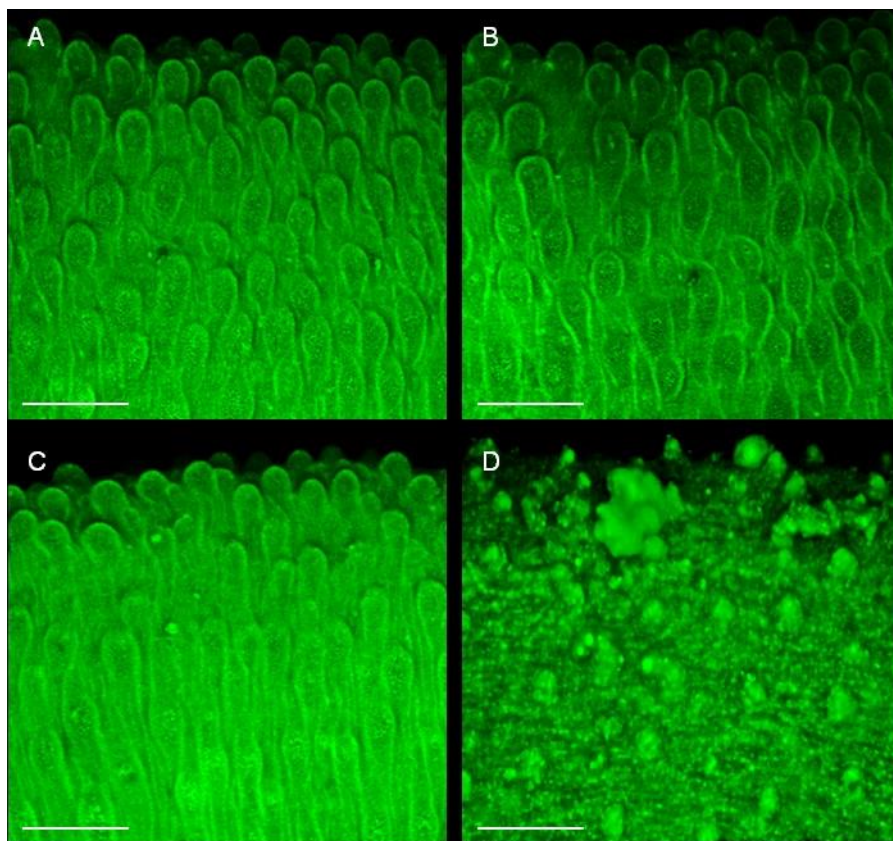


Figura 4. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com praziquantel e amida piplartina administrado individualmente e em combinações. Vermes machos adultos foram fixados em solução de FAA e as imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal. (A) Controle negativo contendo RPMI 1640 com 0,5% de DMSO. (B): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 0,63 μM praziquantel sozinho. (C): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 1,98 μM piplartina. (D): Danos extensivos no tegumento observado no verme macho resultante de uma combinação de 0,63 μM praziquantel mais 1,98 μM piplartina (0.25LC50:0.5LC50, respectivamente). Barras de escala 50 μM .

3.7. Efeito das combinações EPI-PZQ contra *S. mansoni*.

A atividade do EPI contra o verme de *S. mansoni* adulto de 49 dias de idade foi avaliada *in vitro* utilizando diferentes concentrações do alcaloide, pelo que a taxa de mortalidade foi observada ao longo do tempo de incubação de 72 horas. A combinação de EPI e PZQ foi testada, bem como diferentes proporções dos dois fármacos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5. Foi observado que as doses 305,80 μM e 1,26 μM , com IC 0,86 apresentaram efeito sinérgico contra o parasita. A sinergia entre os dois compostos também é indicada no isoblograma (Figura 7C). Nesta proporção (metade da CL50 do EPI, com a CL50 cheia de PZQ), observou-se morte de verme a 100%, enquanto nas duas outras proporções

apresentadas na Tabela 5, ambas contendo menos que a LC50 de PZQ, foram observados efeitos sinérgicos (IC menor ou igual a 1). De fato, para EPI e PZQ. Os efeitos sinérgicos só foram observados em uma concentração (ver quadro S4, Informação de apoio).

Considerando a atividade antiesquistossomica sinérgica desta combinação EPI-PZQ, o efeito de compostos sozinhos ou em combinação no tegumento do parasita foi avaliado utilizando CLSM e SEM (Fig. 5 e Fig. 6, respectivamente). De forma semelhante aos dados de mortalidade, apenas danos tegumentares leves foram observados em vermes adultos de *S. mansoni* tratados com PZQ de 1,26 μM sozinhos. Neste caso, o tegumento apareceu intacto nos dados do CLSM (figura 5B), e o SEM foi necessário para ver mudanças mais sutis (Figura 6C), incluindo pequenos buracos na superfície do tegumento e tubérculos ligeiramente deprimidos. Alterações semelhantes foram também observadas à menor concentração de PZQ testada (0,63 μM , figura 6B). No entanto, os dados CLSM não mostraram quaisquer alterações globais significativas. Por outro lado, as alterações no tegumento causadas por 305,8 μM de EPI foram um pouco mais significativas, incluindo alterações morfológicas nos tubérculos e perda das espinhas nos tubérculos (Fig. 5C). A perda de espinhos também é aparente a partir dos dados do CLSM, embora não tão clara, e a morfologia global parecia semelhante ao controle.

Em contraste, quando os dois compostos foram combinados nas mesmas concentrações, foram observados danos tegumentares extensivos ao longo da superfície do verme no CLSM (Fig. 5D). Estes incluíram erosão, furos e alterações globais na morfologia do tegumento (Figs 5D e 6G). Mais uma vez, a combinação de EPI e PZQ conduziu a efeitos maiores do que os compostos individuais na mesma concentração. Note-se que embora a Tabela 5 mostre apenas resultados selecionados, foram testadas muitas combinações diferentes de EPI e PZQ, e os resultados restantes estão incluídos na tabela S4 (informações suplementares).

Tabela 5. Efeito da epiisopiloturina (EPI) e praziquantel (PZQ) em *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade após 72 horas.

	Epiisopiloturina	Praziquantel	Epiisopiloturina +	
Razão testada	(vermes mortos) ^a	(vermes mortos)	Praziquantel	CI*

		^a	(vermes mortos) ^a	
LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	611.61 ^b (50%)	0.315 ^b (0%)	611.61 ^b + 0.315 ^b (50%)	1.25
0.5LC ₅₀ :LC ₅₀	305.80 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	305.80 ^b + 1.26 ^b (100%)	0.86
0.5LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	305.80 ^b (0%)	0.63 ^b (0%)	305.80 ^b + 0.63 ^b (0%)	1.00

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinado (IC) menos que 1.0 indica sinergismo.

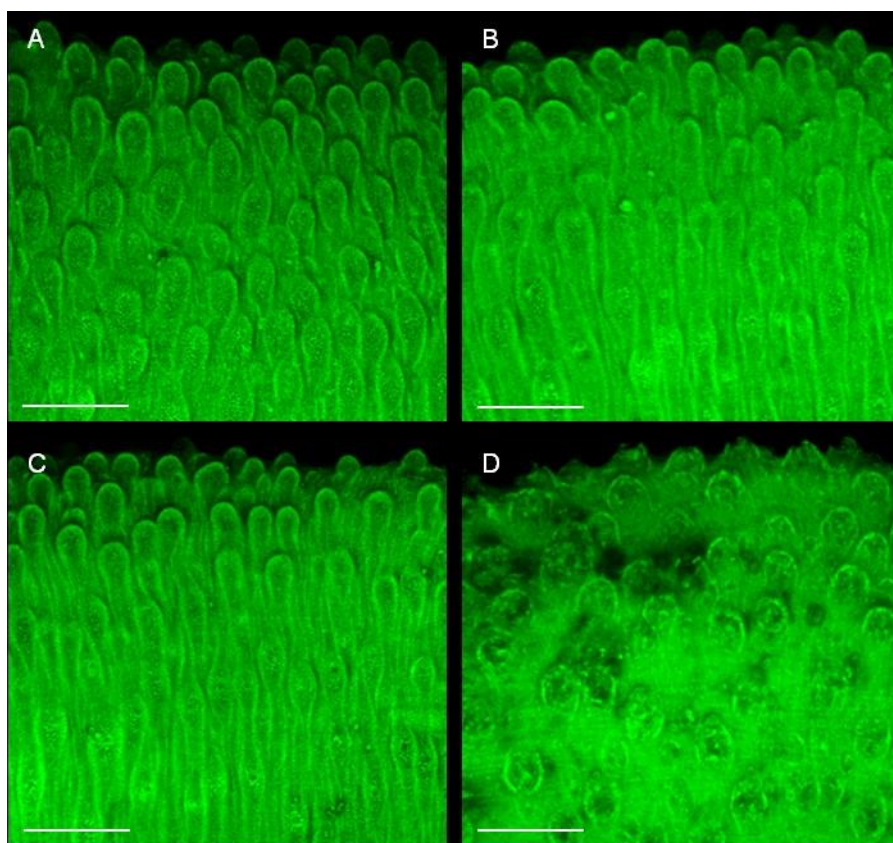


Figura 5. Microscopia confocal de varredura a laser para investigação de vermes adulto de *S. mansoni* tratados com praziquantel e alcalóide episopiloturina administrado individualmente e em combinações. Vermes machos adultos foram fixados em solução de FAA e as imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal. (A) Controle negativo contendo RPMI 1640 com 0,5% de DMSO. (B): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 1,26 μM praziquantel sozinho. (C): Estrutura tegumentar de um verme macho tratado com 305,8 μM episopiloturina. (D): Danos extensivos no tegumento observado no verme

macho resultante de uma combinação de 1,26 μM praziquantel mais 305,8 μM epiisopiloturina (0.5LC50:LC50, respectivamente). Barras de escala 50 μM .

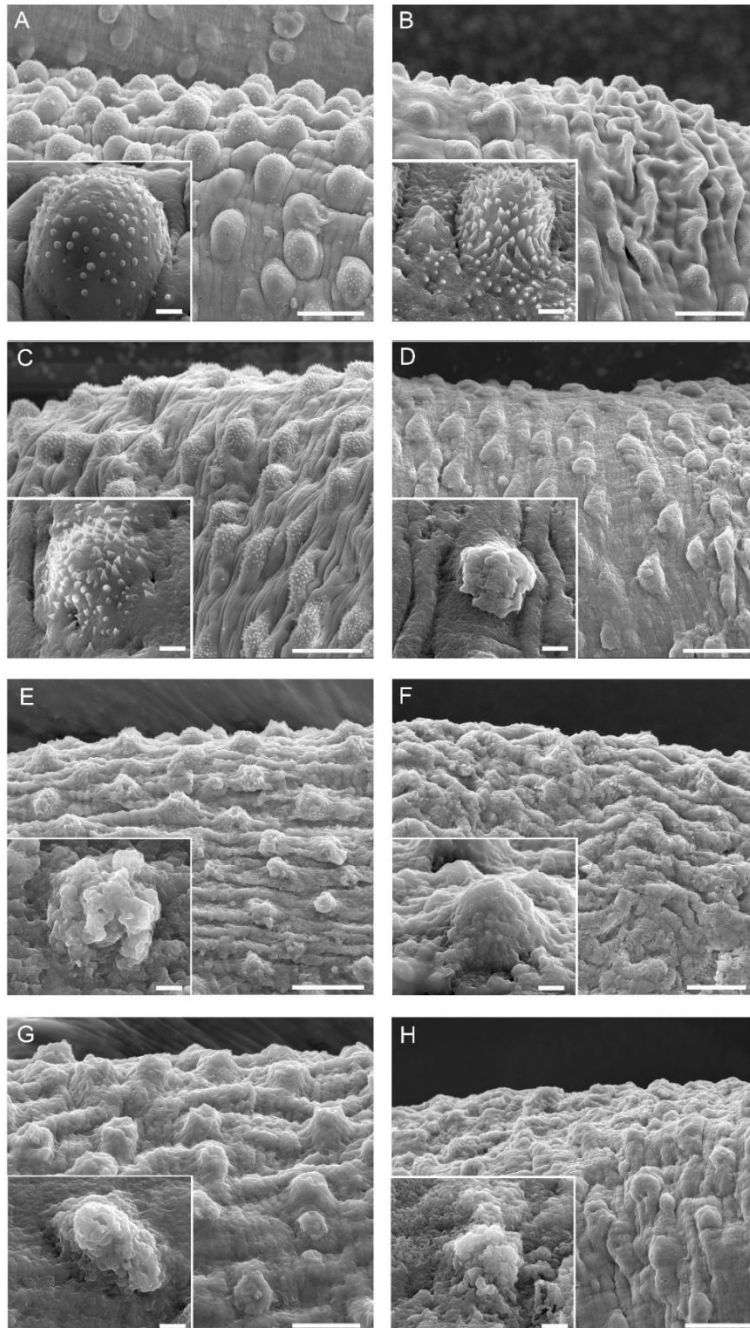


Figura 6. Imagem por SEM do tegumento dorsal de vermes machos de *S. mansoni*, todas as imagens mostram um sinal eletrônico secundário. A: Controle. Vermes tratados com: B: 0,63 μM PZQ; C: 1,26 μM PZQ; D: 306 μM de EPI; E: 1,98 μM PPT; F: Combinação de 0,63 μM de PZQ e 1,98 μM de PPT; G: Combinação de PZQ de 1,26 μM e EPI de 306 μM ; H: Combinação de PPT de 1,98 μM e EPI de 306 μM . As barras de escala nas imagens principais representam 20 μm , e na inserção 2 μm .

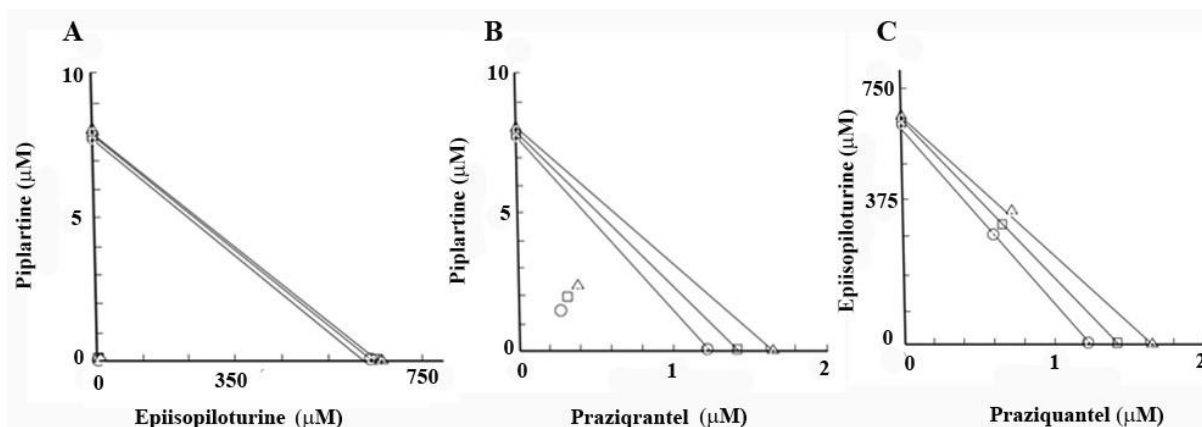


Figura 7. Isobogramas para efeito combinado de PPT e EPI (A), PPT e PZQ (B), EPI e PZQ (C) contra *Schistosoma mansoni*. Fa: fração afetada. Círculo: Fa = 0,5. Quadrado: Fa = 0,75. Triângulo: Fa = 0,9.

3.8. Avaliação de citotoxicidade.

A avaliação da citotoxicidade de EPI, PPT e PZQ, isoladamente ou em combinação, foi realizada contra células Vero, L929 e MDCK. Os resultados mostraram que não houve alteração morfológica significativa nas linhas celulares após a exposição ao EPI, PPT e PZQ isoladamente ou em combinação (Fig. 8A-8L). Adicionalmente, foi feita uma avaliação quantitativa do efeito dos fármacos sobre a viabilidade celular. Neste caso, tomando as células Vero como exemplo, as células permaneceram viáveis ao longo do tempo (72 h) e, deste modo, não se observou qualquer sinal de citotoxicidade com fármacos isolados ou em combinação (Figura 8M).

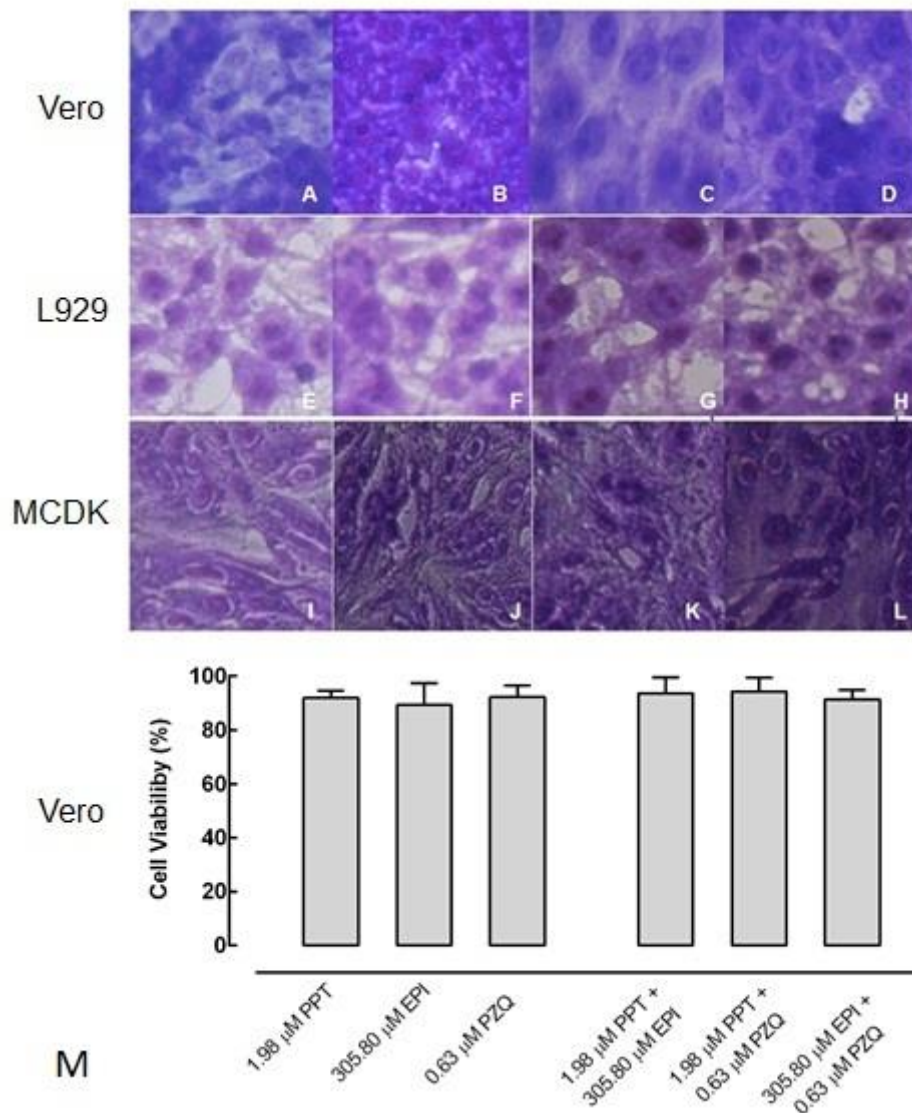


Figura 8. Avaliação morfológica dos efeitos nas células VERO (8A a 8D), L929 (8E a 8H) e MDCK (8I a 8M) sob coloração violeta de cristal após 72 horas de incubação, expostas a: controle de crescimento de células A. VERO; B. EPI - 57600 µM; C. PPT - 9,4 µM; D. Combinação de EPI e PPT; E. L929 controle do crescimento celular; F. EPI - 57600 µM; G. PPT - 9,4 µM; H. Combinação de EPI e PPT; I. Controle do crescimento das células MDCK; J. EPI-57600 µM ; K. PPT - 25,21 µM; L. Combinação de EPI e PPT. Escala base, 10 µm. M. Viabilidade celular de células tipo VERO.

4. DISCUSSÃO.

Os objetivos do uso de dois ou mais fármacos para tratar a esquistossomose são o aumento da eficácia do fármaco, a redução da resistência, o uso de doses individuais menores e a redução dos efeitos colaterais de cada fármaco [46]. Por conseguinte, os compostos EPI, PPT e PZQ foram testados *in vitro* contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, de modo a determinar a LC50 e LC100 do isolado e do composto combinado. O índice de combinação foi também determinado e os isobogramas foram plotados para avaliar se a combinação destes fármacos era sinérgica, aditiva ou antagônica

As quatro propriedades físico-químicas associadas à "regra de cinco" de Lipinski foram calculadas para EPI, PPT e PZQ [47]. Esta regra é um guia comum para identificar moléculas com potenciais propriedades farmacocinéticas [48,49]. Os parâmetros avaliados incluem um peso molecular inferior a 500 Da, Log P (coeficiente de partição) inferior a 5, doadores de ligação de hidrogénio inferiores a 5 e menos de 10 aceitadores de ligação de hidrogénio. Um maior LogP indica uma preferência para interações hidrofóbicas [50-52]. Considerando os cálculos de similaridade entre os compostos, verificou-se que a similaridade geral de PZQ para EPI é maior do que é para PPT. Além disso, o cálculo da semelhança do EPI com PZQ e PPT confirmou novamente que a similaridade mais importante foi entre PZQ e EPI.

Por outro lado, o sinergismo entre fármacos não é um resultado simples de que uma das drogas combinadas apresenta lipofilicidade, mas depende da lipofilicidade de ambos os fármacos em um par de drogas. O logaritmo do coeficiente de partição entre n-octanol e água tem sido amplamente utilizado nos estudos de relação quantitativa estrutura atividade (QSAR) como parâmetro principal para a caracterização da lipofilicidade [53,54]. O mecanismo de ação do PZQ não é claro, com um alvo desconhecido. Portanto, foi escolhido um método de predição independente do alvo, proposto por Yilancioglu e colaboradores de trabalho [55]. Foram realizados cálculos baseados em superfícies de áreas polares para analisar as interações medicamentosas em pares e para prever como os compostos lipofílicos se comportariam em ensaios de sinergismo. Em testes preliminares de PPT versus EPI, a densidade eletrônica das nuvens π dos anéis aromáticos destes

compostos sobrepõe-se, sugerindo que a parte hidrofóbica da molécula pode ser responsável pelo aumento da atividade. A lipofilicidade destas moléculas são altamente semelhantes como indicado pelo potencial de lipofilicidade molecular, LogP virtual. De acordo com estes resultados, a EPI é um excelente composto para estudos posteriores. A regra de cinco de Lipinski sugere que a EPI pode ser adequada para ser administrado pela via oral em outras aplicações potenciais. Baseado nestes dados pode-se sugerir a razão para a melhor interação que está sendo observado no caso entre PPT-PZQ. Estes compostos tinham valores de LogP muito semelhantes, sugerindo que ambos os compostos poderiam atuar de forma semelhante.

A atividade *in vitro* contra formas jovens e adultas do parasita *S. mansoni* foi previamente observada para uma combinação de PPT e do péptido DS-01 [37]. Resultados semelhantes foram também relatados para combinações de PZQ-mefloquina; PZQ-artemisinina e PZQ-oxamniquina [56, 57]. Portanto, as atividades *in vitro* de combinações de PPT e PZQ; EPI e PZQ; E EPI e PPT contra os vermes adultos de *S. mansoni* foram determinados pela medida de LC50 e LC100. A associação entre EPI e PZQ a 305,80 μM e 1,26 μM , respectivamente, mostrou atividade antiesquistossoma, o que não foi observado quando estes fármacos foram testados sozinhos nas mesmas concentrações.

A combinação de PPT (0,63 μM) e PZQ (1,98 μM) causou a morte de todos os vermes *S. mansoni* com IC 0,42 (Tabela 4), mostrando forte sinergia entre os compostos. Também se observou forte sinergia nas outras proporções destes dois compostos testados. Foram observadas fortes alterações no tegumento do parasita na presença de ambos os compostos, mostrando mais efeitos do que quando os fármacos foram utilizados isoladamente (Figuras 4D e 6F). A combinação de PPT e EPI *in vitro* foi também mais eficiente do que os compostos isolados na maioria das razões testadas (Tabela 3). Estudos anteriores relataram que o EPI tem atividade *in vitro* contra vermes adultos e jovens de *S. mansoni* e atividade em vermes adultos do parasita quando o EPI foi encapsulado em lipossomas [12,13]. Dados anteriores mostraram que o PPT tem atividade contra vermes adultos e jovens de *S. mansoni* em diferentes estágios e reduz consideravelmente sua oviposição [16, 17, 37]. Os dados aqui apresentados indicam um forte efeito do PPT contra vermes adultos,

mesmo a baixas concentrações. Assim, PPT é mais eficiente do que EPI em todas as fases do parasita [13, 16, 17].

O tegumento dos parasita é geralmente considerado de grande importância na absorção de nutrientes, funções secretoras e proteção parasitária contra o sistema imunológico do hospedeiro [58,59]. Além disso, tem sido considerado como alvo principal para drogas antiesquistossoma. Para determinar se os tratamentos foram capazes de afetar o tegumento e a superfície externa dos vermes, a morfologia dos vermes tratados foi avaliada por duas técnicas microscópicas diferentes: microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). No presente estudo, as combinações PZQ-EPI, PZQ-PPT e PPT-EPI causaram danos extensos ao tegumento na superfície dos vermes quando observados pelo CLSM e SEM, resultando em alterações significativas na morfologia geral do parasita. Estas alterações foram maiores do que quando cada composto foi utilizado sozinho. Assim, estes resultados confirmaram o efeito sinérgico induzido por PPT-PZQ e PPT-EPI, bem como o efeito aditivo induzido por EPI-PZQ. Relatos anteriores mostraram que o EPI e o PPT promovem alterações graves no tegumento do parasita *S. mansoni* causando a morte [13,16,17,37]. O EPI na concentração mais elevada (5760 μM) não causou alterações na morfologia celular.

Os fármacos isolados ou em combinação não apresentaram qualquer sinal de citotoxicidade nos tipos de células de mamífero VERO, MDCK e L929, em comparação com os efeitos de PPT isoladamente, o que pode ser observado na Figura 8, estudos anteriores relataram que EPI não apresentou citotoxicidade para células vero ou para macrófagos peritoneais de ratos [13] e que PPT em baixas concentrações também não eram tóxicos para células tipo VERO [17]. Estes resultados sugerem que as combinações destes fármacos em concentrações mais baixas podem ser mais seguras e mais eficazes.

CONCLUSÕES.

Este trabalho demonstra que as combinações de fármacos in vitro PZQ-EPI, PPT-PZQ e PPT-EPI apresentaram atividade anti-helmíntica contra vermes adultos de *S. mansoni*. Apresentando um importante efeito sinérgico, especialmente para a combinação entre PPT e PZQ, sugerindo que estas combinações indicam um

tratamento antiesquistossoma eficaz promissor. A epiisopiloturina e a piplartina ainda não foram autorizadas para utilização em seres humanos, o que abre o caminho para estudos *in vivo* que podem indicar a utilização combinada destes compostos na terapia da esquistossomose em comparação com o tratamento atual com PZQ, promovendo efeitos biológicos contra o parasita e apresentando uma baixa toxicidade.

AGRADECIMENTOS.

Agradecemos ao Sr. Jefferson S. Rodrigues pela assistência técnica na manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP). Agradecemos ao Dr. Henrique K. Roffato (Instituto Butantan, São Paulo, SP) pelo auxílio na microscopia confocal (FAPESP, 00 / 11624-5). Os autores agradecem à CAPES / FAPEPI pela bolsa concedida; Ao CNPq para o financiamento através do programa PROCAD / Casadinho / CNPq (Biotec / UFPI e USP São Carlos), Ciência Sem Fronteiras (400398 / 2014-1) e Programa PPSUS FAPEPI / CNPq 2013; À CAPES para Rede Nanobiomed (705/2009) e Phytobios LTDA (Grupo Centroflora). A ACM agradece à FAPESP (2014 / 02282-6). A YPM agradece ao CNPq (Grant 302674 / 2010-1). O trabalho na UCIBIO / Requite foi apoiado por trabalho também foi apoiado pela Fundação para a Ciência e uma Tecnologia (FCT) pela não concessão. Com o apoio financeiro da FCT / MEC através de fundos nacionais e co-financiados

MATERIAL SUPLEMENTAR.

Tabela S1. Parâmetros adicionais calculados das três moléculas estudadas

	PZQ	PPT	EPI
Solubilidade	-2.41	-2.39	-1.52
Score-Droga	0.391	0.89	0.94
H Aceptores	4	6	5
H Doadores	0	0	1
Capacidade Livre de Rotação	1	5	4

Tabela S2. Efeito da amida piplartina e alcalóide epiisopiloturina em vermes machos adulto de *S.mansoni* com 49 dias de idade após 72 horas.

Razão testada	PPT (vermes mortos) ^a	EPI (vermes mortos) ^a	PPT + EPI (vermes mortos) ^a	IC*
LC ₅₀ :LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	611.61 ^b (50%)	7.87 ^b + 611.61 ^b (100%)	1.71
LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	305.80 ^b (0%)	7.87 ^b + 305.80 ^b (100%)	1.27
LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	152.90 ^b (0%)	7.87 ^b + 152.90 ^b (100%)	1.05
LC ₅₀ :0.125LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	76.45 ^b (0%)	7.87 ^b + 76.45 ^b (100%)	0.94
LC ₅₀ :0.0625LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	38.22 ^b (0%)	7.87 ^b + 38.22 ^b (50%)	1.06
0.5LC ₅₀ :LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	611.61 ^b (50%)	3.94 ^b + 611.61 ^b (100%)	1.29
0.5LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	305.80 ^b (0%)	3.94 ^b + 305.80 ^b (100%)	0.85
0.5LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	152.90 ^b (0%)	3.94 ^b + 152.90 ^b (100%)	0.63
0.5LC ₅₀ :0.125LC ₅₀	3.94 ^b	76.45 ^b	3.94 ^b + 76.45 ^b	0.63

	(0%)	(0%)	(50%)	
0.25LC ₅₀ :LC ₅₀	1.98 ^b	611.61 ^b	1.98 ^b + 611.61 ^b	1.08
	(0%)	(50%)	(100%)	
0.25LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	1.98 ^b	305.80 ^b	1.98 ^b + 305.80 ^b	0.61
	(0%)	(0%)	(100%)	
0.125LC ₅₀ :LC ₅₀	0.99 ^b	305.80 ^b	0.99 ^b + 305.80 ^b	0.63
	(0%)	(50%)	(50%)	

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinação (IC) menor que 1.0 indica sinergismo.

Tabela S3. Efeito da piplartina e praziquantel em vermes machos adulto de *S.mansoni* com 49 dias de idade após 72 horas.

Razão testada	PPT (vermes mortos) ^a	PZQ (vermes mortos) ^a	PPT + PZQ (vermes mortos) ^a	IC*
LC ₅₀ :LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	1.26 ^b (50%)	7.87 ^b + 1.26 ^b (100%)	1.2 6
LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	0.63 ^b (0%)	7.87 ^b + 0.63 ^b (100%)	1.0 4
LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	0.315 ^b (0%)	7.87 ^b + 0.315 ^b (100%)	0.9 4
LC ₅₀ :0.125LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	0.158 ^b (0%)	7.87 ^b + 0.158 ^b (100%)	0.8 9
LC ₅₀ :0.0625LC ₅₀	7.87 ^b (50%)	0.79 ^b (0%)	7.87 ^b + 0.79 ^b (50%)	0.9 6
0.5LC ₅₀ :LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	3.94 ^b + 1.26 ^b (100%)	0.8 4
0.5LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	0.63 ^b (0%)	3.94 ^b + 0.63 ^b (100%)	0.6 3
0.5LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	3.94 ^b (0%)	0.315 ^b (0%)	3.94 ^b + 0.315 ^b (100%)	0.5 2
0.25LC ₅₀ :LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	1.98 ^b + 1.26 ^b (100%)	0.6 3
0.25LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	1.98 ^b (0%)	0.63 ^b (0%)	1.98 ^b + 0.63 ^b (100%)	0.4 2
0.25LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	1.98 ^b	0.315 ^b	1.98 ^b + 0.315 ^b	0.5

(0%)	(0%)	(50%)	0
------	------	-------	---

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinação (IC) menor que 1.0 indica sinergismo.

Tabela S4. Efeito da amida piplartina e alcalóide epiisopiloturina em vermes machos adulto de *S.mansoni* com 49 dias de idade após 72 horas.

Razão testada	EPI (vermes mortos) ^a	PZQ (vermes mortos) ^a	EPI + PZQ (vermes mortos) ^a	CI
LC ₅₀ :LC ₅₀	611.61 ^b (50%)	1.26 ^b (50%)	611.61 ^b + 1.26 ^b (100%)	1.3 0
LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	611.61 ^b (50%)	0.63 ^b (0%)	611.61 ^b + 0.63 ^b (100%)	1.0 9
LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	611.61 ^b (50%)	0.315 ^b (0%)	611.61 ^b + 0.315 ^b (50%)	1.2 5
0.5LC ₅₀ :LC ₅₀	305.80 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	305.80 ^b + 1.26 ^b (100%)	0.8 6
0.5LC ₅₀ :0.5LC ₅₀	305.80 ^b (0%)	0.63 ^b (0%)	305.80 ^b + 0.63 ^b (0%)	1.0 0
0.5LC ₅₀ :0.25LC ₅₀	305.80 ^b (0%)	0.315 ^b (0%)	305.80 ^b + 0.315 ^b (0%)	1.3 8
0.25LC ₅₀ :LC ₅₀	152.90 ^b (0%)	1.26 ^b (50%)	152.90 ^b + 1.26 ^b (50%)	1.2 5

^a Porcentagem relativa de 20 vermes investigada.

^b Valores expressos em concentrações micromolar.

* Um valor do índice combinação (IC) menor que 1.0 indica sinergismo.

REFERÊNCIAS

- [1] D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis, *Lancet*. 383 (2014) 2253–2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
- [2] R. Bergquist, J. Utzinger, D.P. McManus, Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008) e244. doi:10.1371/journal.pntd.0000244.
- [3] P. Steinmann, J. Keiser, R. Bos, M. Tanner, J. Utzinger, Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk, *Lancet Infect. Dis.* 6 (2006) 411–425. doi:10.1016/S1473-3099(06)70521-7.
- [4] M.J. Doenhoff, D. Cioli, J. Utzinger, Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis., *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21 (2008) 659–667. doi:10.1097/QCO.0b013e328318978f.
- [5] P. Hagan, C.C. Appleton, G.C. Coles, J.R. Kusel, L.-A. Tchuem-Tchuenté, Schistosomiasis control: keep taking the tablets, *Trends Parasitol.* 20 (2004) 92–97. doi:10.1016/j.pt.2003.11.010.
- [6] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477. doi:10.1021/np068054v.
- [7] J.Moraes, Natural products with antischistosomal activity, *Future Med Chem.* 7 (2015) 801-820. doi: 10.4155/fmc.15.23.
- [8] O. Kayser, A.F. Kiderlen, S.L. Croft, Natural products as antiparasitic drugs, *Parasitol. Res.* 90 (2003) S55–S62. doi:10.1007/s00436-002-0768-3.
- [9] I.N. Abreu, Y.H. Choi, A.C.H.F. Sawaya, M.N. Eberlin, P. Mazzafera, R. Verpoorte, Metabolic alterations in different developmental stages of *Pilocarpus microphyllus*, *Planta Med.* 77 (2011) 293–300. doi:10.1055/s-0030-1250314.
- [10] O.S. Vysotskaia, S.K. Mushinskaia, I. V Shostenko, [Quantitative determination of alkaloids of pilocarpus in plant raw materials and in semiproducts of pilocarpine production]., *Farmatsevtichnyĭ Zhurnal.* 21 (1966) 61–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5992858> (accessed September 9, 2016).
- [11] H. Link, K. Bernauer, Über die Synthese der *Pilocarpus* -Alkaloide Isopilosin und Pilocarpin, sowie die absolute Konfiguration des (+)-Isopilosins, *Helv. Chim. Acta.* 55 (1972) 1053–1062. doi:10.1002/hlca.19720550402.
- [12] M.A. Guimarães, Y.D.M. Campelo, L.M.C. Vêras, M.C. Colhone, D.F. Lima, P.

- Ciancaglini, S.S. Kuckelhaus, F.C.A. Lima, J. de Moraes, J.R. de S.A. Leite, Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 4519–4528. doi:10.1166/jnn.2014.8248.
- [13] L.M. Veras, M. Guimaraes, Y.D. Campelo, M.M. Vieira, C. Nascimento, D.F. Lima, L. Vasconcelos, E. Nakano, S.S. Kuckelhaus, M.C. Batista, J.R. Leite, J. Moraes, Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 2051–2058. doi:10.2174/092986712800167347.
- [14] M.J. Kato, M. Furlan, Chemistry and evolution of the Piperaceae, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 529–538. doi:10.1351/pac200779040529.
- [15] D.P. Bezerra, G.C.G. Militão, F.O. de Castro, C. Pessoa, M.O. de Moraes, E.R. Silveira, M.A.S. Lima, F.J.M. Elmiro, L.V. Costa-Lotufo, Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways., *Toxicol. Vitro.* 21 (2007) 1–8. doi:10.1016/j.tiv.2006.07.007.
- [16] J. de Moraes, C. Nascimento, P.O.M. V Lopes, E. Nakano, L.F. Yamaguchi, M.J. Kato, T. Kawano, *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine., *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 357–364. doi:10.1016/j.exppara.2010.08.021.
- [17] J. Moraes, C. Nascimento, L.F. Yamaguchi, M.J. Kato, E. Nakano, *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula, *Exp. Parasitol.* 132 (2012) 222–227. doi:10.1016/j.exppara.2012.07.004.
- [18] N. Yin, W. Ma, J. Pei, Q. Ouyang, C. Tang, L. Lai, Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology, *PLoS One.* 9 (2014) e93960. doi:10.1371/journal.pone.0093960.
- [19] L. Zhao, M.G. Wientjes, J.L.-S. Au, Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses., *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7994–8004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1087.
- [20] J.D. Planer, M.A. Hulverson, J.A. Arif, R.M. Ranade, R. Don, F.S. Buckner, Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e2977. doi:10.1371/journal.pntd.0002977.

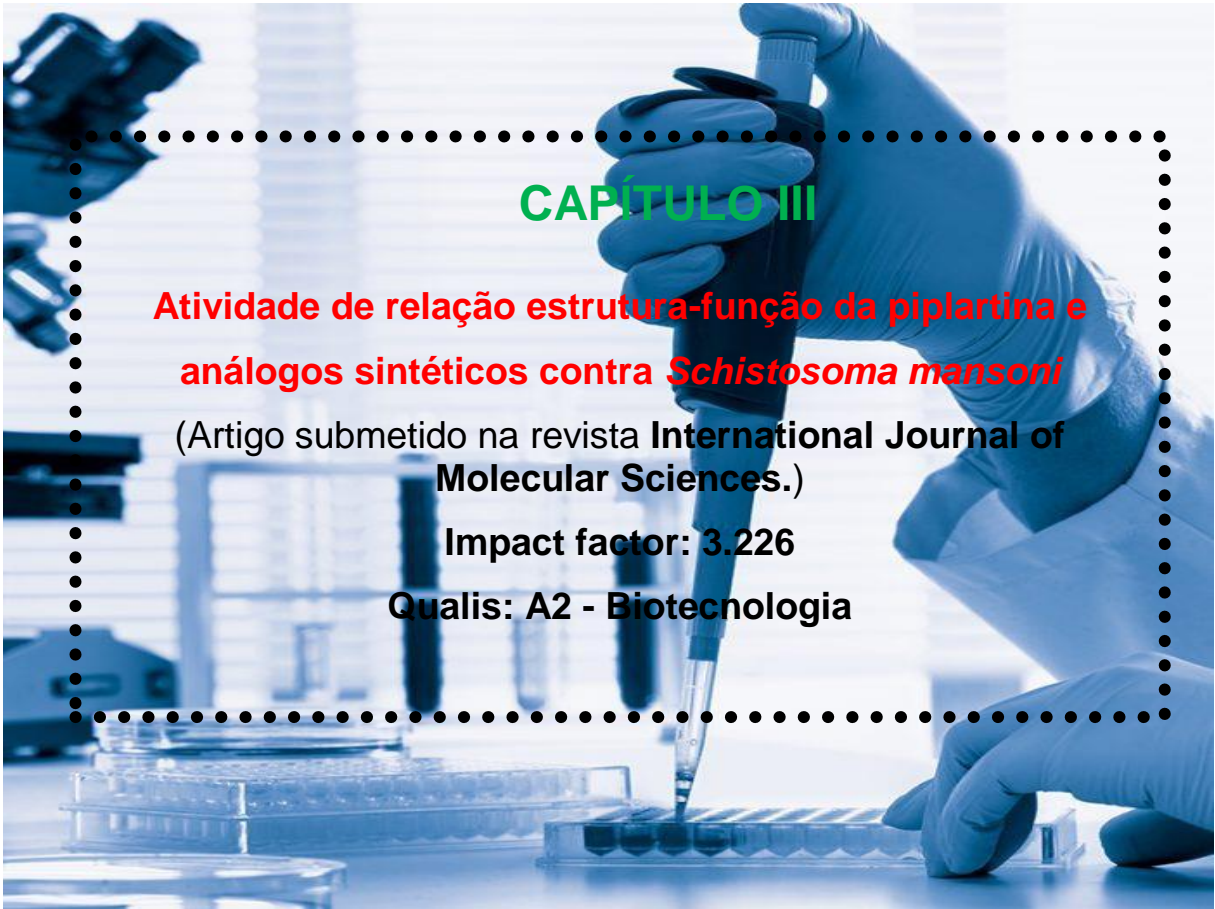
- [21] C. Ma, L. Wang, X.-Q. Xie, GPU Accelerated Chemical Similarity Calculation for Compound Library Comparison, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 1521–1527. doi:10.1021/ci1004948.
- [22] J. Yang, J. Kim, W. Kim, Y.H. Kim, Measuring User Similarity Using Electric Circuit Analysis: Application to Collaborative Filtering, *PLoS One.* 7 (2012) e49126. doi:10.1371/journal.pone.0049126.
- [23] M. Xue, S. Zhang, C. Cai, X. Yu, L. Shan, X. Liu, W. Zhang, H. Li, M. Xue, S. Zhang, C. Cai, X. Yu, L. Shan, X. Liu, W. Zhang, H. Li, Predicting the Drug Safety for Traditional Chinese Medicine through a Comparative Analysis of Withdrawn Drugs Using Pharmacological Network, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013) 256782. doi:10.1155/2013/256782.
- [24] L.A.C. Vaz de Lima, A.S. Nascimento, MolShaCS: a free and open source tool for ligand similarity identification based on Gaussian descriptors., *Eur. J. Med. Chem.* 59 (2013) 296–303. doi:10.1016/j.ejmech.2012.11.013.
- [25] N. Homeyer, A.H.C. Horn, H. Lanig, H. Sticht, AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine., *J. Mol. Model.* 12 (2006) 281–289. doi:10.1007/s00894-005-0028-4.
- [26] A.W. Sousa da Silva, W.F. Vranken, ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE, *BMC Res. Notes.* 5 (2012) 367. doi:10.1186/1756-0500-5-367.
- [27] A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs, *J. Mol. Graph. Model.* 21 (2002) 47–49. doi:10.1016/S1093-3263(02)00123-7.
- [28] A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming., *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 18 (2004) 167–173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368917> (accessed September 9, 2016).
- [29] T. Sander, J. Freyss, M. von Korff, J.R. Reich, C. Rufener, OSIRIS, an Entirely in-House Developed Drug Discovery Informatics System, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 232–246. doi:10.1021/ci800305f.
- [30] D. Biswas, S. Roy, S. Sen, A simple approach for indexing the oral druglikeness of a compound: discriminating druglike compounds from

- nondruglike ones., J. Chem. Inf. Model. 46 (2006) 1394–1401. doi:10.1021/ci050459i.
- [31] I. V Tetko, V.Y. Tanchuk, Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 42 (2002) 1136–1145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377001> (accessed September 9, 2016).
- [32] L.M.C. Véras, V.R.R. Cunha, F.C.D.A. Lima, M.A. Guimarães, M.M. Vieira, Y.D.M. Campelo, V.Y. Sakai, D.F. Lima, P.S. Carvalho, J.A. Ellena, P.R.P. Silva, L.C. Vasconcelos, M. Godejohann, H.M. Petrilli, V.R.L. Constantino, Y.P. Mascarenhas, J.R. de Souza de Almeida Leite, Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis., PLoS One. 8 (2013) e66702. doi:10.1371/journal.pone.0066702.
- [33] H.M.D. Navickiene, V. da S. Bolzani, M.J. Kato, A.M.S. Pereira, B.W. Bertoni, S.C. França, M. Furlan, Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography., Phytochem. Anal. 14 (2003) 281–284. doi:10.1002/pca.716.
- [34] J. Keiser, K. Ingram, M. Vargas, J. Chollet, X. Wang, Y. Dong, J.L. Vennerstrom, In vivo activity of aryl ozonides against *Schistosoma* species, Antimicrob. Agents Chemother. 56 (2012) 1090–1092. DOI: 10.5772/27740
- [35] J. de Moraes J, R.N.de Oliveira , J.P. Costa, A.L. Junior, D.P.de Sousa, R.M.Freitas, S.M.Allegretti, P.L.Pinto, Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*, PLoS Negl Trop Dis. 8 (2014) e2617. doi: 10.1371/journal.pntd.0002617.
- [36] A.C. Mafud, M.P. Silva, D.C. Monteiro, M.F. Oliveira, J.G. Resende, M.L. Coelho, D.P. de Sousa, R.Z. Mendonça, P.L. Pinto, R.M. Freitas, Y.P. Mascarenhas, J.de Moraes, Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite, Chem Biol Interact. 244 (2016);244 129-139. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.003.

- [37] J. de Moraes, J. Keiser, K. Ingram, C. Nascimento, L.F. Yamaguchi, C.R. Bittencourt, M.P. Bemquerer, J.R. Leite, M.J. Kato, E. Nakano, In vitro synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms., *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 301–309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23061657> (accessed September 9, 2016).
- [38] P.V. Quelemes, M.L. Perfeito, M.A. Guimarães, R.C. dos Santos, D.F. Lima, C. Nascimento, M.P. Silva, M.J. Soares, C.D. Ropke, P. Eaton, J. de Moraes, J.R. Leite, Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms, *J Ethnopharmacol.* 175 (2015) 287-94. doi: 10.1016/j.jep.2015.09.026.
- [39] A.C. Mafud, L.G. Ferreira, Y.P. Mascarenhas, A.D. Andricopulo, J. de Moraes, Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches, *Trends Parasitol.* 32 (2016) 874-886. doi: 10.1016/j.pt.2016.08.002.
- [40] T.C. Chou, Drug combinations: from laboratory to practice., *J. Lab. Clin. Med.* 132 (1998) 6–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665365> (accessed September 9, 2016).
- [41] S. de Lima-Netto, A. Pinheiro, E. Nakano, R.M. Zucatelli Mendonça, D.M. Barros Battesti, R.Z. Mendonça, Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), *Cytotechnology.* 64 (2012) 601–606. doi:10.1007/s10616-012-9444-3.
- [42] A.Omar, Gel-S. Elmesallamy, S.Eassa, Comparative study of the hepatotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of praziquantel distocide & the natural myrrh extract Mirazid on adult male albino rats, *J Egypt Soc Parasitol.* 35 (2005) 313-329.
- [43] A.L.R.D. Souza, T. Andrianib, R. N. D. Oliveira, C.P. Kiill, F. K.D. Santos, S.M. Allegretti, M. V. Chaudé, E.B. Souto, A.M. Silva, M.P. D. Gremião, In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment, *Int J Pharm.* 10 (2014) 31-37. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.022.

- [44] A.P. Silva, M.P. Silva, C.G. Oliveira, D.C. Monteiro, P.L. Pinto, R.Z. Mendonça, J.S.J. Costa, R.M. Freitas, J. de Moraes, Garcinielliptone FC: antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells, *Toxicol In Vitro*. 4 (2015) 681-687. doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.014.
- [45] T. Sander, J. Freyss, M. von Korff, C. Rufener, DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis., *J. Chem. Inf. Model*. 55 (2015) 460–473. doi:10.1021/ci500588j.
- [46] J.R. Lambertucci, A new approach to the treatment of acute schistosomiasis., *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz*. 84 Suppl 1 (1989) 23–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2517865> (accessed September 9, 2016).
- [47] C.A. Lipinski, Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five., *Drug Discov. Today*. 8 (2003) 12–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546981> (accessed September 9, 2016).
- [48] R. Rettig, P. Gohlke, T. Unger, [Relations between pharmacokinetics and effectiveness of ACE inhibitors]., *Zeitschrift Für Kardiol*. 80 Suppl 2 (1991) 16–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2024539> (accessed September 9, 2016).
- [49] D.J. Parks, L. V LaFrance, R.R. Calvo, K.L. Milkiewicz, J.J. Marugán, P. Raboisson, C. Schubert, H.K. Koblish, S. Zhao, C.F. Franks, J. Lattanze, T.E. Carver, M.D. Cummings, D. Maguire, B.L. Grasberger, A.C. Maroney, T. Lu, Enhanced pharmacokinetic properties of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione antagonists of the HDM2-p53 protein-protein interaction through structure-based drug design., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 16 (2006) 3310–3314. doi:10.1016/j.bmcl.2006.03.055.
- [50] J. Kujawski, M.K. Bernard, A. Janusz, W. Kuźma, Prediction of log *P*: ALOGPS Application in Medicinal Chemistry Education, *J. Chem. Educ*. 89 (2012) 64–67. doi:10.1021/ed100444h.
- [51] N. Ram, H. Kalász, E. Adeghate, F. Darvas, F. Hashemi, K. Tekes, Medicinal chemistry of drugs with active metabolites (N-, O-, and S-desalkylation and some specific oxidative alterations)., *Curr. Med. Chem*. 19 (2012) 5683–5704. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934779> (accessed September 9, 2016).
- [52] R. Wang, Y. Fu, L. Lai, A New Atom-Additive Method for Calculating Partition

- Coefficients, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 37 (1997) 615–621. doi:10.1021/ci960169p.
- [53] E. Rutkowska, K. Pajak, K. Józwiak, Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry., *Acta Pol. Pharm.* 70 (n.d.) 3–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610954> (accessed September 9, 2016).
- [54] G. Vistoli, A. Pedretti, B. Testa, Partition coefficient and molecular flexibility: the concept of lipophilicity space., *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 1152–1169. doi:10.1002/cbdv.200900072.
- [55] K. Yilancioglu, Z.B. Weinstein, C. Meydan, A. Akhmetov, I. Toprak, A. Durmaz, I. Iossifov, H. Kazan, F.P. Roth, M. Cokol, Target-independent prediction of drug synergies using only drug lipophilicity., *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 2286–2293. doi:10.1021/ci500276x.
- [56] J. Keiser, T. Manneck, M. Vargas, Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and in vitro., *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 1791–1797. doi:10.1093/jac/dkr178.
- [57] J. Utzinger, J. Keiser, X. Shuhua, M. Tanner, B.H. Singer, Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials., *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1487–1495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12709312> (accessed September 9, 2016).
- [58] J.J. Van Hellemond, K. Retra, J.F.H.M. Brouwers, B.W.M. van Balkom, M. Yazdanbakhsh, C.B. Shoemaker, A.G.M. Tielens, Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome., *Int. J. Parasitol.* 36 (2006) 691–699. doi:10.1016/j.ijpara.2006.01.007.
- [59] P.J. Skelly, R. Alan Wilson, Making sense of the schistosome surface., *Adv. Parasitol.* 63 (2006) 185–284. doi:10.1016/S0065-308X(06)63003-0.



CAPÍTULO III

**Atividade de relação estrutura-função da pipartina e
análogos sintéticos contra *Schistosoma mansoni***

(Artigo submetido na revista **International Journal of
Molecular Sciences.**)

Impact factor: 3.226

Qualis: A2 - Biotecnologia

**Avaliação da relação função-estrutura da piplartina e seus análogos sintéticos
contra *Schistosoma mansoni***

Yuri Dias Macedo Campelo^{1,2,3}, Alicia Ombredane⁴, Andreeane G. Vasconcelos⁵, Lucas F. F. Albuquerque⁶, Daniel C. Moreira⁵, Alexandra Placido⁷, Ana Lydia⁸, Ana Carolina Mafud^{9,10}, Yvonne P. Mascarenhas⁹, Cristina Delerue-Matos⁷, Tatiana K. S. Borges⁶, Graziella A. Joanitti⁴, Daniel Arcanjo¹¹, Massuo J. Kato⁸, Selma S. Kucklhaus⁵, Josué Moraes¹², Jose Roberto S.A. Leite^{5*}

¹Biodiversity and Biotechnology Research Center, Biotec, Federal University of Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, 64202020, Brazil.

²Graduate Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

³Institute of Higher Education of Vale do Parnaíba, FAHESP/IESVAP, Parnaíba, PI, Brazil.

⁴Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Campus Darcy Ribeiro, UnB, Brasília, DF, Brazil.

⁵Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil.

⁶Laboratorio de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil.

⁷LAQV/REQUIMTE, GRAQ, Instituto Superior de Engenharia do Porto, ISEP, Porto, Portugal.

⁸Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

⁹Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil.

¹⁰Department Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, 4051, Switzerland.

¹¹Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, NPPM, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brazil.

¹²Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade de Guarulhos, Guarulhos, SP, Brazil.

Resumo

Doenças infecciosas e negligenciadas como a esquistossomose causam milhares de mortes por ano em todo o mundo e são um importante problema de saúde pública. A esquistossomose é uma doença comum em áreas tropicais, sendo a espécie *Schistosoma mansoni* a principal responsável por provocar esta doença em seres humanos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a relação estrutura - função entre piplartina e seus análogos sintéticos contra *Schistosoma mansoni*, bem como a citotoxicidade em células de mamíferos. A Piplartina foi isolada das raízes de *Piper tuberculatum* e os análogos foram sintetizados a partir de modificações químicas. A atividade da piplartina e seus análogos foi testada contra parasitas adultos de *S. mansoni* por estudos *in vitro* / *silico*; fibroblastos murinos (NIH3T3) por ensaio MTT; e macrófagos de murino (J774) através do método de citometria de fluxo. Piplartina mostrou atividade contra o *S.mansoni*, mas os análogos não. Da mesma forma, a piplartina exibiu alguma toxicidade em células de mamíferos por ambos os métodos e os análogos 1G e 14B mostraram uma redução na viabilidade celular em concentrações de 400 e 800 µg / mL. No entanto, o tratamento com piplartina e análogos parece reduzir a citotoxicidade do seu veículo (DMSO) em células J774. Este estudo demonstrou que os análogos de piplartina, quando comparados com a piplartina, apresentaram perda de atividade contra o *S. mansoni* e, conseqüentemente, os análogos apresentaram menor toxicidade quando comparados à piplartina.

Palavras - Chave: Piplartina, analogos, *Schistosoma mansoni*, citotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas e negligenciadas como a esquistossomose causam milhares de mortes por ano no mundo, sendo um grande problema de saúde pública [1]. As esquistossomoses são doenças comuns de áreas tropicais, existindo dois tipos principais de esquistossomose: a intestinal e a urogenital [2]. Os causadores desta patologia são parasitas digenéticos pertencentes ao gênero *Schistosoma* [3]. A espécie *Schistosoma mansoni* é a principal responsável por provocar esta doença em humanos [1].

Atualmente o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina são os principais fármacos utilizados no tratamento desta patologia [4]. Estes fármacos mesmo sendo utilizados, continua ainda com o seu mecanismo de ação incerto [5]. Estudos laboratoriais em camundongos, foram observados cepas resistentes de *S.mansoni* com a exposição repetida de doses sub-letais ao praziquantel, com isto existe uma busca de produtos naturais ativos para a utilização no tratamento da segunda doença mais prevalente no mundo [5,6].

No Brasil, na região Nordeste, já foram descobertas diversas plantas com metabolitos ativos que tem alguma atividade biológica, dentre estas plantas destaca-se a da família *Piperácea* que são conhecidas por apresentar diversos compostos com atividades antimicrobianas [7]. Entre estes, a piplartina (3,4,5-trimetoxicinamoil-Ndi-hidropiridin-2-ona) também conhecido como piperlongumina, encontrado em no gênero *Piper* [8] apresenta atividade anti-inflamatório, antitumoral, antifúngica e antiparasitária [9,10,11,12]. Estudos tem mostrado que a piplartina tem sido utilizada para estudos contra doenças parasitárias, apresentando atividade contra o parasita *S.mansoni* em associações com outras moléculas como isolada [13]. Estudos de síntese de novos análogos a partir da piplartina vem sendo feitos com o intuito de testar biologicamente estes análogos contra diversas patologias, baseado em estudos moleculares estabelecendo uma relação entre estruturas químicas desta moléculas e seus efeitos biológicos [14].

A atividade de uma molécula não é caracterizada apenas pela sua atividade biológica contra microrganismos, mas também a sua toxicidade em diferentes células de mamíferos, estudos de toxicidade vem sendo feito em diversas moléculas para comprovar a sua viabilidade para a realização de testes em humanos [15]. Considerando que existe uma dificuldade no controle da esquistossomose e que algumas moléculas tem uma alta toxicidade, este trabalho tem como objetivo de avaliar o efeito esquistossomicida e toxicidade dos análogos sintetizados a partir da piplartina, de acordo com a relação estrutura química destas moléculas e seus efeitos biológicos comparado a amida piplartina, para possíveis aplicações biomédicas e biotecnológicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Piplartina e Sínteses dos analógos

As raízes de *Piper tuberculatum* foram colhidas no Campus da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. A classificação botânica foi realizada pelo Dr. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Um espécime de voucher (Kato-0169) foi depositado no Herbário do mesmo instituto. A piplartina foi previamente isolada de raízes secas de *P. tuberculatum* de acordo com o procedimento publicado [16].

As amidas 1g e 14b foram sintetizadas pela adição de trietilamina (3 equiv.) E amina (pirrolidina) a uma solução de cloreto de acila (1 equiv) em CH₂Cl₂. Para preparar o cloreto de acila, é mantida uma solução de ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (1 equiv.), ambos obtidos de Sigma Aldrich, em THF seco (10 mL) sob atmosfera de nitrogênio (N₂), adicionou-se cloreto de oxalila (5 equiv.) gota a gota e agitou-se à temperatura ambiente durante 5-6 h. O excesso de cloreto de oxalila foi então removido sob pressão reduzida produzindo o correspondente cloreto de ácido [14]. A mistura reacional foi agitada durante a noite à temperatura ambiente e depois interrompida com NH₄Cl aquoso saturado e extraída com CH₂Cl₂ (3 vezes). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de NaCl diluída e secas sobre MgSO₄. Após filtração e concentração, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna flash para obtenção da amida desejada [17].

Os compostos 1m e 6b foram sintetizados por adição a uma solução de ácido (2E) -3,4,5-trimetoxicinâmico e ácido 4-nitrocinâmico (1 equiv.) Em THF 0,9 equiv. De N, N'-díciclo-hexilcarbodiimida (DCC). A mistura reacional foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. A mistura foi seca numa rotavapor para remover o solvente restante. O produto foi dissolvido com DCM e uma solução saturada de NaHCO₃ foi adicionada, depois a solução resultante foi então lavada 3 vezes com DCM. A fase orgânica foi combinada, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão. O produto cristalino obtido foi então recristalizado em metanol quente ou purificado por cromatografia [14].

O Composto 19a foi obtido por adição a uma solução de cloreto de ácido (1 equiv.) Em THF 1 equiv. Butanol. O ácido (2E, 4E) -5- (3,4,5-trimetoxifenil) penta-2,4-dienóico foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Marques et al [18] O ácido cloridrato, a partir do ácido (2E, 4E) -5- (3,4,5-trimetoxifenil) penta-2,4-dienóico, foi preparado como descrito anteriormente. O mesmo procedimento de purificação foi utilizado como descrito anteriormente [14].

2.2. Cálculos Teóricos

Os cálculos da Teoria da Densidade Funcional (DFT) [19] foram realizados para determinar a energia dos orbitais que estão de ligação com b3lyp [20] e o conjunto de bases 6-311g com duas funções de polarização (d, p) e funções difusas para hidrogênio (++) foi utilizado para cálculos teóricos o software Gaussian 09 [21]. A estrutura do momento do dipolo foi realizada para determinar a exibição da densidade elétron utilizando o software GaussView 5.0.

2.3. UV-VIS Spectro de absorção

Os espectros de absorção de luz ultravioleta e visível de piplartina e análogos foram obtidos com um espectrofotômetro UV-1280 (Shimadzu). A piplartina purificada e os análogos (1G, 1M, 6B e 14B) foram solubilizados em acetonitrila de grau HPLC e diluídos até uma concentração de 15 µg/mL. Devido à alta absorbância e baixa solubilidade, o análogo 19A foi ainda diluído para 7,5 µg/mL antes das leituras. As varreduras foram feitas usando uma cubeta de quartzo de comprimento de tamanho de 1 cm na faixa de 200-450 nm comparando a uma linha de base registrada com acetonitrila à temperatura ambiente.

2.4. Estudos físico-químicos e de toxicidade *in silico*

As estruturas 2D foram projetadas com Marvin Sketch 17.4.3, 2017, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). As estruturas 3D foram otimizadas geometricamente pelo AMMP, um programa de dinâmica molecular completo para manipular moléculas pequenas e macromoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e outros polímeros [22]. As taxas de Ammp-Mon foram adicionadas e a força de campo AMBER foi aplicada para minimizar a conformação de energia, através de um algoritmo genético, com 3000 passos, aplicando a constante dielétrica da água. A pesquisa conformacional foi realizada usando o método de salto Boltzmann, com torções flexíveis e psi, a 300 K, com constante dielétrica igual a 80,000 e RMSD igual a 60,00.

As propriedades físico-químicas também foram calculadas, tais como pesos moleculares (MW), lipofilicidade (logP), solubilidade do coeficiente octanol-água (logD), solubilidade em água (logS), ligações rotativas, área de superfície polar topológica (tPSA), número de aceptores de ligações de hidrogênio e número de doadores de ligações de hidrogênio através da Chemicalize, uma ferramenta web para prever parâmetros básicos, geométricos, estruturais e de solubilidade, Cálculo, agosto / 2017, <https://chemicalize.com/> desenvolvido por ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

As análises de toxicidade foram realizadas por pkCSM [23,24]. A atividade biológica da piplartina e dos seus análogos foram feitas usando o programa na web Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics 2017).

2.5. Ensaio de citotoxicidade.

As células de fibroblasto murino (NIH-3T3) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (Brasil) e as células de macrófagos de murino de camundongos ATCC número: TIB-67, cultivadas em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Life, EUA) completado com 10% de soro de bovino fetal

inativado pelo calor (Life, EUA) e 1% de solução antibiótica (100 UI / mL de Penicilina - 100 µg / mL de Estreptomicina, Vida, EUA) a 37°C e 5% de CO₂.

Para o ensaio de viabilidade, as células NIH-3T3 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de 3×10^3 células em meio de cultura DMEM durante a noite a 37 ° C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Em seguida, o meio foi alterado e várias concentrações de amostras reconstituídas em 3% de DMSO foram aplicadas (25 - 800 µg / mL). DMSO (3%) foi utilizado como controle. Para o ensaio de viabilidade por método de citometria de fluxo, as células J774 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células em meio de cultura de DMEM durante 2 horas a 37 ° C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida e nas amostras foram diluídas com a adição 1% DMSO para uma concentração final de 25, 100 e 400 µg / mL. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 ° C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida [25].

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o método de redução de MTT (3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio do meio seco. Após 24 h de incubação, foram adicionados 15 µL da solução MTT (5 mg / mL em tampão fosfato) a cada poço e a placa foi incubada durante 2 h a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida. A cultura média foi descartada e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi monitorada usando um espectrofotômetro com um leitor de microplacas a 595 nm (Molecular Devices, EUA). Para o experimento de citometria de fluxo, após 24 de incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (10 mM de HEPES / NaOH pH 7,4, 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂). As células foram tratadas com 2 µL de Annexin-V FITC (BD, EUA) e 2 µL de PI (50 µg / mL) durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente, posteriormente foram adicionados mais de 100 µL de tampão de ligação e a amostra analisada por fluxo citômetro. Um total de 20.000 eventos foram coletados por amostra.

2.6. Avaliação esquistossomicida *in vitro*

2.6.1. Organismos utilizados e manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*

A linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 utilizada neste trabalho foi a BH (Belo Horizonte, MG). Os parasitas foram mantidos em caramujos

Biomphalaria glabrata Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* (hospedeiro definitivo), como descrito por Moraes [26]. Para a manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni*, os roedores foram infectados, subcutaneamente (com seringa de 1 ml), com aproximadamente 150 cercárias. Após 49 dias, os animais foram eutanasiados (em câmara de CO₂) para a retirada do fígado e obtenção dos miracídios de acordo com Pellegrino e Siqueira (1956).

Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de cultura de células (placas com 24 poços), contendo água filtrada e 10 miracídios. A exposição do molusco aos miracídios foi realizada sob a luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W), durante 4 horas. Após 30 dias, os moluscos foram colocados sob a luz artificial para a eliminação das cercarias, durante 30 minutos. As cercárias foram utilizadas na infecção dos hamsters, completando, portanto, o ciclo experimental (Pellegrino e Siqueira, 1956). As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final de DMSO é de 0,5 a 1% (v/v), conforme descrito por Moraes [26].

2.6.2. Recuperação dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Para verificar a atividade esquistossomicida nos experimentos *in vitro*, os parasitos foram recuperados pela técnica de perfusão do sistema porta hepático como descrito por Smithers e Terry [27]. A perfusão foi realizada com meio RPMI 1640 contendo e heparina sódica 5 UI/ml 49 dias após infecção (para recuperação de verme adulto). Os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ [28].

2.6.3. Experimentos *in vitro* com vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os ensaios *in vitro* com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os pares de vermes obtidos dos hamsters por perfusão foram

lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina B 2 µg/ml (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos em placas para cultura de células com 24 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 ml do meio RPMI 1640 supracitado, porém suplementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM. Os vermes foram incubados com os análogos da amida piplartina utilizando diferentes concentrações (50 µM, 25 µM, 10 µM e 5 µM); Piplartina 10 µM e 25 µM (controle positivo) por até 96 horas; praziquantel 2 µM foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura usados como controle negativo [29].

As culturas de vermes adultos foram monitoradas por microscopia ou lupa. Para avaliar a toxicidade dos compostos sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), alterações morfológicas no tegumento e a capacidade reprodutiva [29]. A mortalidade dos vermes julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos ou quando tocados com uma pinça [29].

2.7. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Revisão Institucional do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil; número de aprovação 405/15). Todos os animais foram manipulados em conformidade com a boa prática animal conforme definido pela Comité de Ética em Uso Animal.

2.8. Análises gráficas e estatísticas

As diferenças estatísticas entre o controle e as células tratadas foram avaliadas por ANOVA e Bonferroni post hoc test, em Graph Pad Prism 5.03

(GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os valores foram expressos como médias \pm SEM, e $p < 0,05$ foi definido como significância estatística ".

3. Resultados

3.1. Calculos Teóricos e UV-VIS Spectro de absorção

A Figura 01 representa os dados de densidade eletrônica das amidas testadas, evidenciando que a piplartina obteve maior momento de dipolo com 5,47. As cores tendendo a vermelho tendem a ter uma carga mais negativa sendo mais polar. Enquanto as cores tendendo ao azul são mais positivas. A figura 2 é o espectro de absorção de luz ultravioleta da piplartina e seus análogos, no comprimento de onda de absorbância na faixa entre 280 – 400 nm.

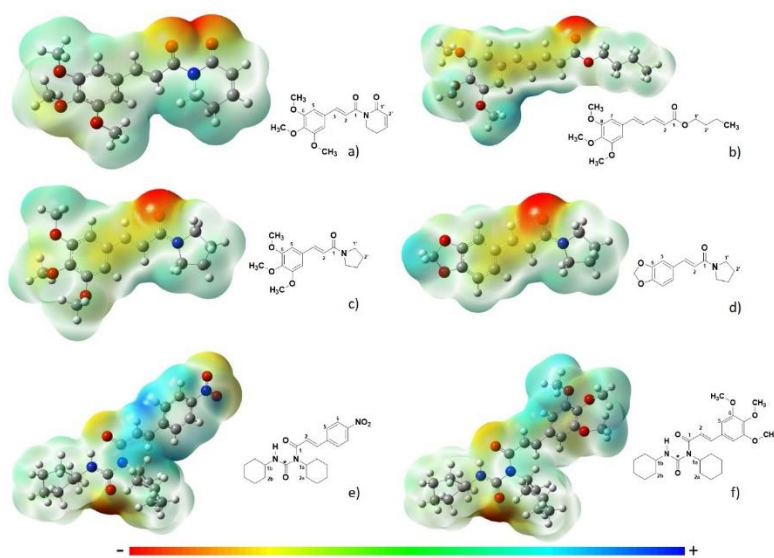


Figura 1. Densidade eletrônica: a) piplartina, b) 19, c) 1g, d) 14b, e) 6b e f) 1m. As cores representam vermelho (negativo) e azul (positivo). Valor de Momento dipolo de todas os compostos: Pip: 5.4728337; 1g: 1.9658996; 1m: 4.4568136; 6b: 4.0062111; 14b: 3.9403826; 19a: 3.7385640.

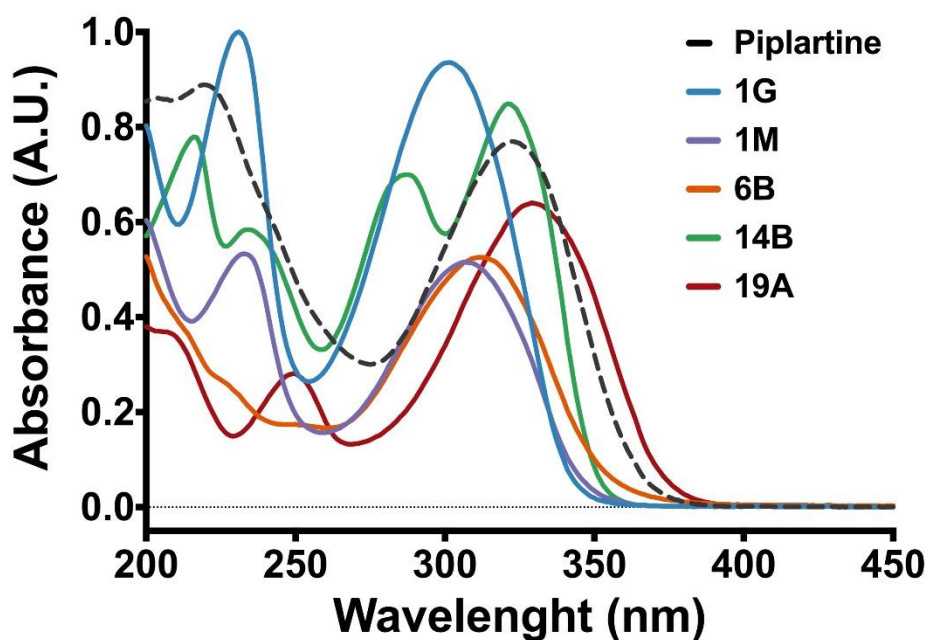


Figura 2. Espectros de absorção de luz ultravioleta e visível de piplartina e análogos. Comprimento de onda da absorbância máxima na faixa de 280-400.

3.2. Estudos *in silico*

Para investigar as diferenças entre a piplartina e seus análogos, foi realizada uma análise estrutural e físico química, calculando a área de superfície vdW (vdW), a superfície do potencial eletrostático molecular (MEP), a superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e a área de superfície polar (PSA), Os valores LogP, solubilidade prevista e peso molecular dos compostos foram preditos utilizando o método ChemAxon, os resultados podem ser observados na tabela 1. Apesar das diferenças significativas na área de superfície, a diferença mais importante entre diz respeito à área de superfície polarizada topológica (TPSA). Os fragmentos presentes nas moléculas foram comparados com uma biblioteca de fragmentos de subestrutura para determinar as características de toxicidade para cada uma das moléculas estudadas, bem como a predição da atividade de toxicidade. Os resultados de predição de toxicidade da piplartina e seus análogos podem ser observados na tabela 2, de acordo com os resultados de toxicidade *in silico* a piplartina apresenta toxicidade e sua capacidade de ligação aos receptores nucleares é maior, quando comparado aos seus análogos, podendo ser uma

explicação para o seu efeito citotóxico que pode ser observados nos testes *in vitro* contra células de mamíferos.

Tabela 1. Parâmetros básicos, geométricos, estruturais e de solubilidade de piplartina e seus análogos.

Compostos	Piplartina	19a	14b	6b	1m	1g
Propriedades básicas						
Contagem de átomos	40	51	31	48	56	38
Mw	315.32	287.31	432.48	387.39	239.27	359.42
Propriedades estruturais						
Contagem de átomos assimétricos	0	0	0	0	0	0
Contagem de títulos rotativos	5	6	2	5	7	5
Contagem de anéis	2	2	3	3	3	2
Contagem de anel aromático	2	1	2	3	3	2
Contagem de anel diferenciado	1	1	2	0	0	1
Contagem de doadores de ligação de hidrogênio	0	0	0	3	1	0
Contagem de aceitadores de ligação de hidrogênio	5	5	2	5	5	4
Carga formal	0	0	0	0	0	0
FSP3 (a)	0.18	0.40	0.13	0.00	0.12	0.19
Topological polar surface area (Å ²)	65.07	65.07	31.23	93.11	77.10	49.69
Refratividade molar cm ³ /mol	87.42	101.15	70.63	112.82	123.64	79.89
Polarização (Å ³)	32.54	38.29	26.66	41.46	46.66	30.59
Parâmetros de solubilidade						
logP	1.89	2.71	2.36	3.55	4.63	2.26
miLogP (b)	2.19	2.78	4.69	5.02	2.86	2.90
logD pH range 1.7-8.0	1.89	2.71	2.36	3.54	4.63	2.26
Solubilidade intrínseca	-3.01	-4.53	-2.87	-4.73	-5.48	-2.81
Categoria de solubilidade	High	Moderate	High	Low	Low	High
logS pH 1.7-8.0	-3.01	-4.53	-2.87	-4.73	-5.48	-2.81
Parâmetros geométricos						
Van der Waals volume (Å ³)	281.06	337.61	213.99	341.62	390.54	260.80
Volume (Å ³) (b)	282.84	263.86	394.07	340.76	218.97	339.43
Van der Waals área de superfície (Å ²)	425.62	543.27	333.75	515.78	620.14	423.69
Área superficial acessível ao solvente (Å ²)	549.15	659.24	445.82	631.17	725.57	577.96
Área superfície polarizada topológica (Å ²)	65.07	65.07	31.2	93.11	77.10	49.69
Absorbância	322 nm	329 nm	321 nm	312 nm	306.5 nm	301.5 nm

(a) Número de carbonos sp³ / número de carbonos. (b) Método MolInspiration.

Tabela 2. Parâmetros básicos, geométricos, estruturais e de solubilidade de piplartina e seus análogos.

Compostos	Piplartina	19a	14b	6b	1m	1g
Predição de toxicidade (c)						
AMES toxicidade	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Max. dose tolerada (human0) (0.505 log mg/kg/day)	1.006	0.677	1.043	1.095	1.051	1.114
hERG I inibidor	Não	Não	Não	Não	Não	Não
hERG II inibidor	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
Toxicidade aguda oral em rato (LD ₅₀) (2.661 mol/kg)	2.268	2.295	2.413	2.195	2.37	2.389
Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL) (3.402 log mg/kg bw/day)	1.64	1.787	1.812	2.455	2.388	1.592
Hepatotoxicidade	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
Sensibilização	Não	Não	Não	Não	Não	Não
<i>T. pyriformis</i> toxicidade (0.285 log µg/L)	1.138	1.359	2.004	0.437	0.658	1.591
Minnow toxicidade(5.577 log mM)	1.293	0.446	1.179	-0.172	-0.914	1.027
Predição de bioatividade (b)						
GPCR ligante	0.13	0.17	0.07	-0.11	-0.04	-0.15
Canal iônico modulador	-0.51	-0.16	-0.53	-0.27	-0.29	-0.54
Kinase inibidora	-0.13	-0.12	-0.13	-0.20	-0.09	-0.14
Ligação ao receptor nuclear	-0.32	-0.07	-0.12	-0.31	-0.30	-0.31
Inibidor de protease	-0.40	0.02	-0.39	-0.38	-0.33	-0.48
Inibidor de Enzima	-0.02	0.05	0.24	-0.17	-0.12	-0.00
(a) Numero de sp ³ carbonos/numero de carbonos. (b) MolInspiration metodo. (c) pkCSM.						

3.3. Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade da piplartina e seus análogos foi avaliada pelo ensaio de MTT na linha de células de fibroblasto murino (NIH-3T3) nas concentrações de 25 a 800 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Os resultados demonstraram que a piplartina diminuiu a viabilidade celular após a exposição durante 24 horas, apresentando toxicidade considerável (Figura 3). Os análogos 1G, 14B e 1M promoveram uma redução considerável na viabilidade celular em concentrações de 400 e 800 $\mu\text{g} / \text{mL}$ quando comparadas à piplartina. Além disso, 1G e 14B apresentaram os valores mais altos de pD_2 e E_{max} quando comparados aos outros análogos (Tabela 3). Por outro lado, os análogos 19A e 6B não mostraram mudanças significativas na viabilidade de células de mamíferos nas concentrações testadas quando comparadas à piplartina (Figura 3). Seus valores de pD_2 foram estimados com base em seus respectivos valores de E_{max} , que foram inferiores a 50% (Tabela 3), indicando menor citotoxicidade quando comparados com piplartina e outros análogos. Assim, entre estes compostos, a piplartina apresentou maior toxicidade. O controle do veículo de dimetilsulfóxido (DMSO) não mostrou nenhum efeito na viabilidade celular.

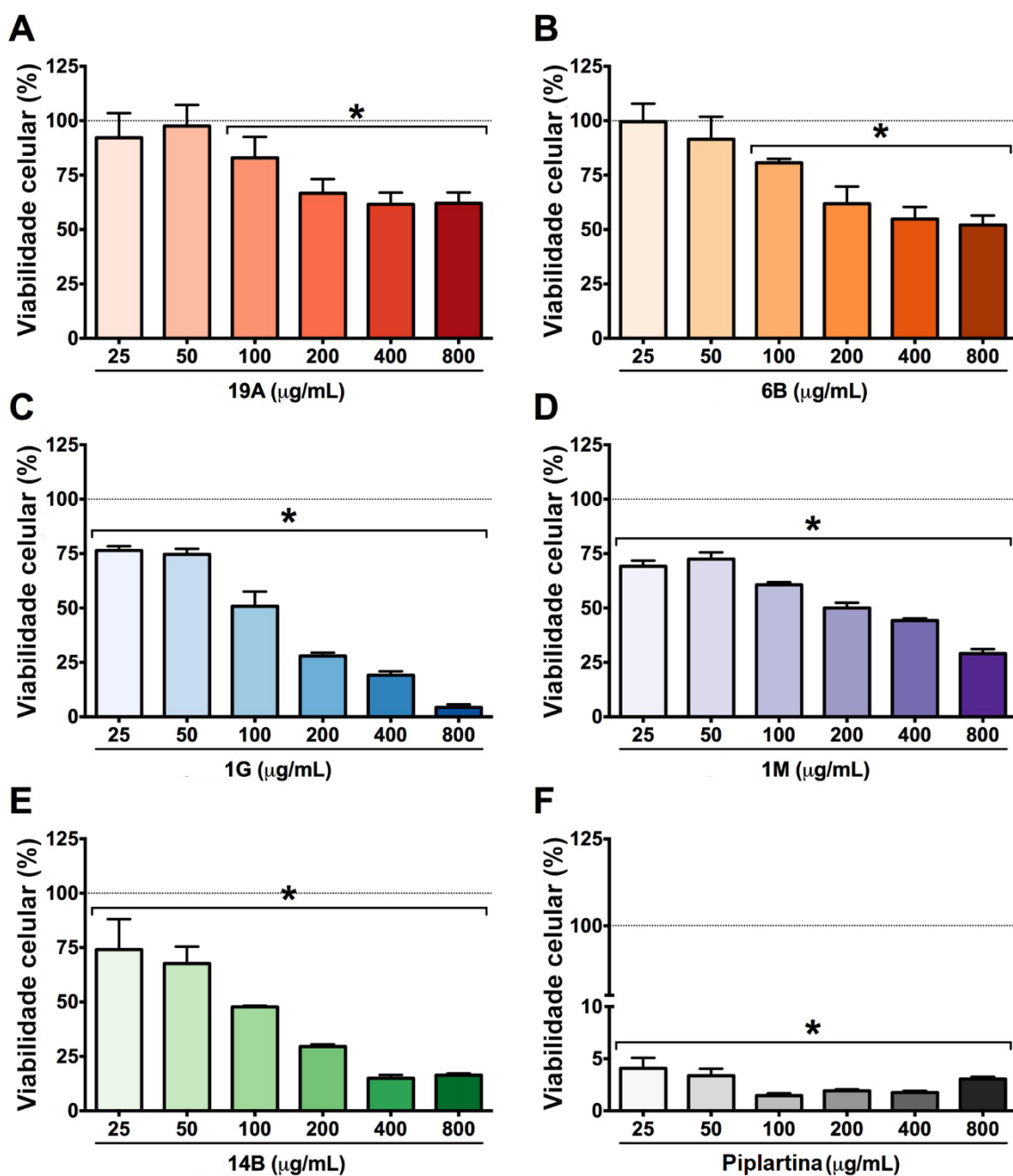


Figura 3. Avaliação de citotoxicidade utilizando o método MTT em células de fibroblastos murinos (NIH3T3) após exposição durante 24 horas para diferentes amostras: piplartina e análogos (19A, 1G, 1M, 14B e 6B) em concentrações de 25 a 800 µg / mL. O DMSO foi usado como controle negativo. Os valores são expressos como média ± SEM. * p < 0,05 versus grupo controle DMSO.

Tabela 3. Determinação de pD₂ e E_{max} para efeito citotóxico de piplartina e análogos em células de fibroblastos murinos (NIH-3T3).

Compostos	pD ₂ (-logIC ₅₀)	E _{max} ^a (%)
19A	-3.06 ± 0.15	37.93 ± 2.85
1G	-2.00 ± 0.03	95.69 ± 0.79
1M	-2.31 ± 0.04	70.94 ± 1.20
14B	-1.95 ± 0.04	83.64 ± 0.47
6B	-2.80 ± 0.08	47.93 ± 2.52
Piplartina	5.68 ± 2.95	96.94 ± 0.12

^a Logaritmo negativo da concentração inibitória média (IC₅₀); ^bE_{max}: diminuição da viabilidade celular na concentração máxima testada (800 µg / mL)

A citotoxicidade da piplartina e seus análogos também foi avaliada por método de citometria de fluxo em células J774 em concentrações de 25, 100 e 400 µg / mL com exposição durante 24 horas (Figura 4). O controle do veículo DMSO mostrou redução significativa (p <0,05) na viabilidade celular, semelhante ao controle de morte celular H₂O₂. A piplartina significativamente (p <0,05) afetou a viabilidade celular em concentrações de 25 e 100 µg / mL quando comparadas ao DMEM sem controle tratado. O análogo 1M em todas as concentrações testadas e análogo 1G a 100 µg / mL alterou significativamente (p <0,05) a viabilidade celular em comparação com o controle negativo, enquanto outros análogos não apresentaram efeito significativo na viabilidade celular. No entanto, o tratamento com piplartina e análogos parece reduzir a citotoxicidade do seu veículo (DMSO) em células J774.

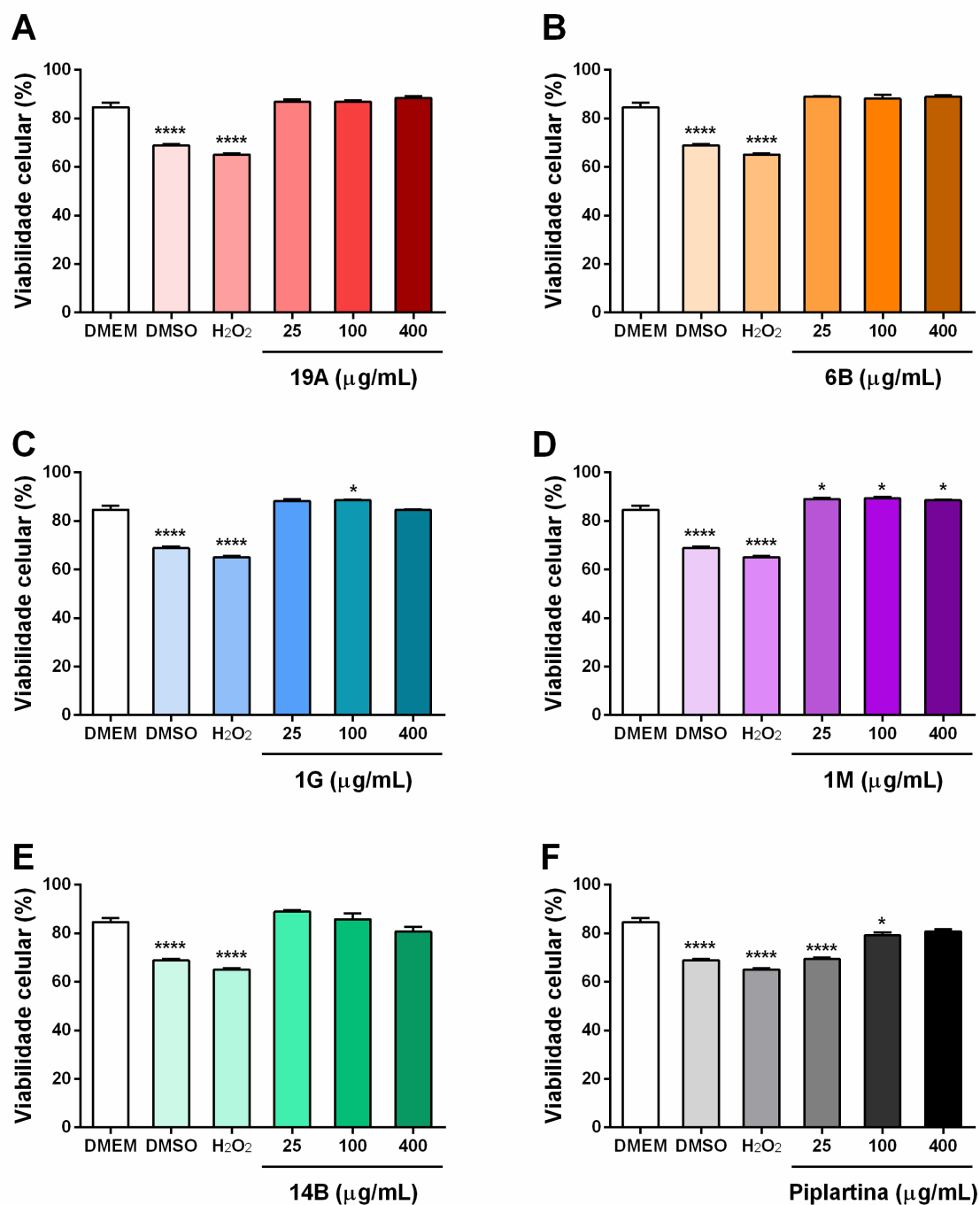


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade em células de macrófagos de murino (J774) após exposição durante 24 horas para piplartina e análogos (19A, 1G, 1M, 14B e 6B) em concentrações de 25, 100 e 400 µg / mL. O DMEM foi usado como controle negativo. As células foram analisadas por citometria de fluxo (20.000 eventos / amostra). Os valores são expressos como média ± SEM. * p <0,05 e **** p <0,0001 versus grupo controle DMEM.

A análise do mecanismo citotóxico parcial foi realizada utilizando manchas de anexina-V FITC e iodeto de propídio (PI) para distinguir células apoptóticas (anexina-V FITC) de células necróticas (PI) por citometria de fluxo (Figura 5 e S3). Como esperado, o controle da morte celular por apoptose (H_2O_2) mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) na intensidade de fluorescência de FITC de Annexin-V em relação ao controle negativo de DMEM. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na coloração de FITC de Annexin-V para células J774 após tratamento com piplartina 25 $\mu g / mL$ e análogo 14B a 400 $\mu g / mL$ quando comparado com o controle negativo de DMEM. Além disso, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o sinal de fluorescência FITC e PI de Annexin-V para cada grupo em células J774 tratadas com piplartina e seus análogos, indicando a apoptose como mecanismo de morte celular principal.

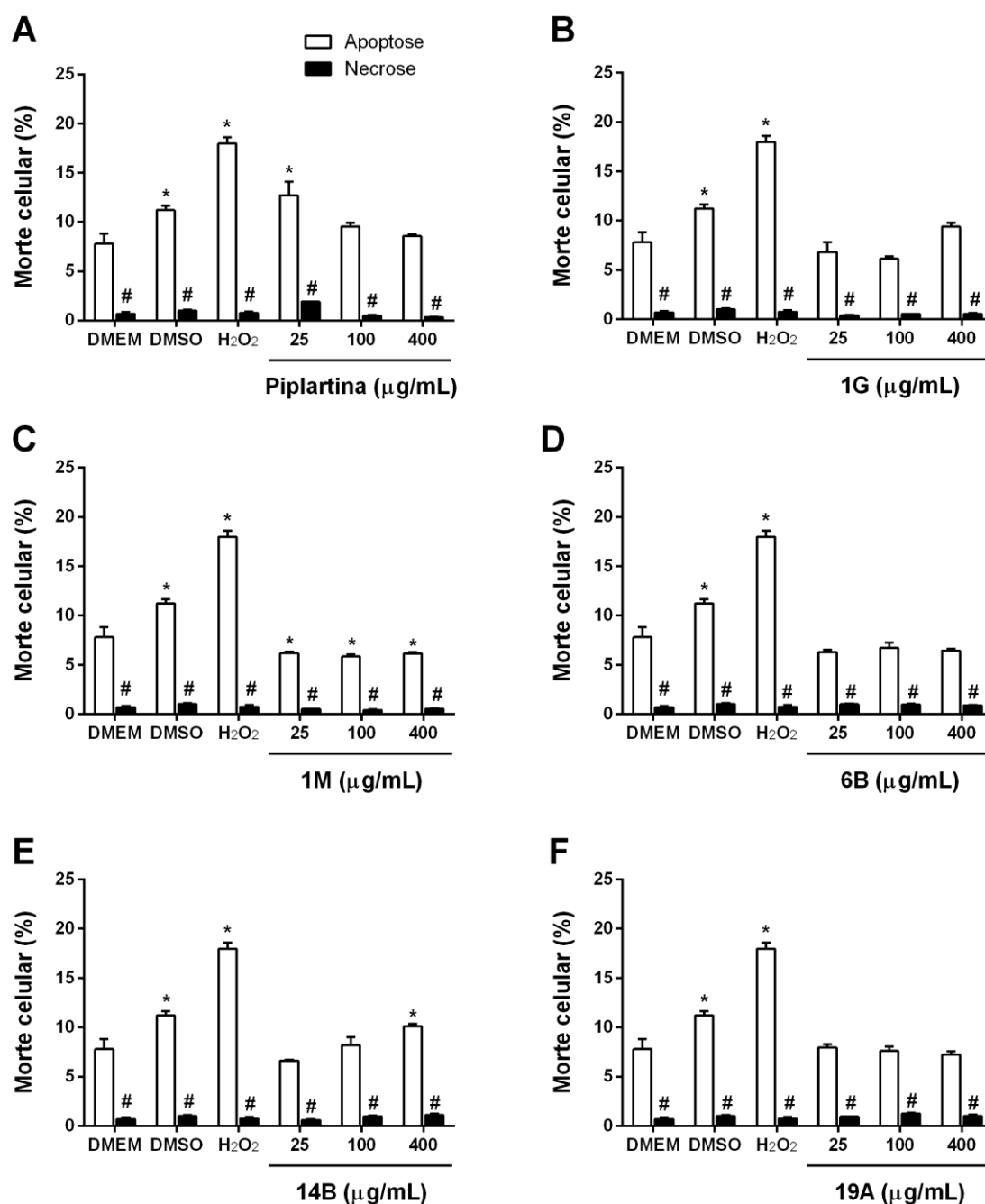


Figura 5. Avaliação do mecanismo de morte celular mediado pela piplartina e seus análogos (19A, 1G, 1M, 14B e 6B) em células J774 após tratamento por 24 h a concentrações de 25, 100 e 400 $\mu\text{g/mL}$ usando FITC de Annexin-V (marcador de apoptose) e marcação de iodeto de propídio (marcador PI, necrose). As células foram analisadas por citometria de fluxo (20.000 eventos / amostra). Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ versus DMEM sem grupo de controle tratado. # $p < 0,05$ contra a coloração com apoptose de seus respectivos grupos.

3.4. Experimentos *in vitro* contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

A atividade da amida piplartina e seus análogos contra o verme adulto de *S. mansoni* de 49 dias foram observado através da concentração e o tempo de incubação de 96 horas. A amida piplartina mostrou atividade contra o parasita 24 horas após a incubação, seus análogos não mostraram atividade contra o parasita nas concentrações testadas, quando comparado à piplartina, resultados que podem ser observados nas tabelas 4 e S1.

Tabela 4. Efeitos *in vitro* de compostos contra *Schistosoma mansoni* adulto de 49 dias de idade.

Grupo	Periodo de incubação (h)	Vermes mortos (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a				
				Leve		Significante		
		M	F	M	F	M	F	
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	0	0	
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0	
	48	0	0	0	0	0	0	
	72	0	0	0	0	0	0	
Praziquantel	24	100	100	0	0	100	100	
	48	100	100	0	0	100	100	
	72	100	100	0	0	100	100	
Amida Piplartina	24	100	100	0	0	100	100	
	10 µM	48	100	100	0	0	100	100
		72	100	100	0	0	100	100
	96	100	100	0	0	100	100	
5 µM	24	0	0	100	100	0	0	
	48	0	0	100	100	0	0	
	72	0	0	100	100	0	0	
	96	60	60	0	0	60	60	

4. Discussão

A esquistossomose, é um problema de saúde pública, com isto existe uma busca constante por fármacos, que possam ser utilizados no tratamento desta doença negligenciada, substâncias que devem apresentar requisitos parecidos com o medicamento padrão, o praziquantel. Medicamentos seguros, que possam ser utilizados em crianças, adultos, idosos e mulheres grávidas que apresentem uma baixa toxicidade e diminuição dos efeitos colaterais, o uso do praziquantel, vem aumentando o número de pacientes que apresentam resistência ao medicamento. A pesquisa de novos compostos anti-helmínticos para tratar a esquistossomose tem se tornado uma grande fonte de pesquisa [30].

Os produtos naturais tem sido uma alternativa para os grandes centros de pesquisas nesta área, para a descoberta de medicamentos, devido a uma grande quantidade de moléculas e atividade biológicas que estas substâncias apresentam. A biodiversidade apresenta uma grande quantidade de compostos que não tem sua atividade ainda descrita, com a evolução da biotecnologia, da genômica, da química medicinal, a descoberta de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose, tem sido um desafio, pois além da atividade biológica é necessário o fármaco apresentar uma baixa toxicidade. Este estudo demonstrou que não foi observada nenhuma alteração significativa em nenhuma das concentrações avaliadas que indicasse que os parasitas iriam morrer. Mas foi observado uma diminuição da toxicidade.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida da piplartina e seus análogos, bem como a atividade de citotoxicidade destes compostos, a atividade dos análogos, foram comparadas ao seu protótipo. Existe diversos estudos que mostram a atividade de diversos produtos naturais contra o parasita *Schistosoma mansoni*, mas não se conhece o mecanismo de ação destes compostos, a piplartina apresenta uma excelente atividade contra este parasita, mas o seu mecanismo de ação ainda não é conhecido [10]. Uma alternativa para a diminuição da resistência, é a síntese química dos medicamentos utilizados, ou de compostos naturais com atividades já descritas na literatura, onde são feitas modificações estruturais químicas, em grupos funcionais destes compostos, que

podem ser responsáveis pela atividade biológica, estas modificações podem aumentar, diminuir ou perder a atividade biológica, em algumas situações estas sínteses promovem diminuição da toxicidade, conseqüentemente com perda da atividade biológica. As alterações estruturais feita na piplartina para produzir os análogos, mostraram uma perda da atividade contra este parasita e uma diminuição da toxicidade. Estudos demonstram que a análise fenotípica ainda é a melhor alternativa para a triagem de anti-helmínticos, um experimento simples e de baixo custo, qualitativo, sendo bastante utilizados nos testes *in vitro* [31,32,29,33].

A piplartina apresentou atividade contra o parasita *S.mansoni* na forma adulta, estudos mostraram que este composto promove alterações na motilidade, promovendo a morte do parasita, não sendo observada nenhuma diferença na resposta obtida para os parasitas machos e fêmeas [10]. De acordo com os resultados teóricos representado na figura 1 e tabela 1 a piplartina apresenta uma maior densidade eletrônica ao redor da molécula apresentando um momento dipolo de 5,47, o que pode influenciar na atividade anti-helmíntica desta molécula.

Estudos já mostraram que o sistema nervoso e muscular dos helmintos é importante em muitas funções biológicas como, percepção sensorial, localização no hospedeiro, invasão, locomoção, reprodução e alimentação. O comprometimento destas funções biológicas, compromete a motilidade do parasita, podendo levar a paralisia e conseqüentemente a morte do parasita. Estudos com fármaco com atividade anti-helmíntica tem se verificado que esta atividade biológica, está relacionada com interações ocorridas por canais iônicos, que são ativados por neurotransmissores, dentre estes neurotransmissores podem ser citados a acetilcolina, γ -ácido aminobutírico (GABA) e glutamato, seguido de outros canais iônicos que são responsáveis pela transmissão de sinais [34].

De acordo com a literatura, pode ser observado que alguns compostos esquistossomicidas causam alterações na motilidade dos parasitas por atuarem em receptores de acetilcolina [35]. Este trabalho não estudou o mecanismo de ação da piplartina e seus análogos, ainda é desconhecido se a piplartina pode ou não interferir com canais iônicos do parasita.

O composto 1g, não apresentou atividade antiesquistossoma nas concentrações testadas, de acordo com a figura 1 e a tabela 1, este composto

apresenta uma baixa densidade eletrônica, apresentando um momento dipolo muito baixo quando comparado a pipartina, alterações nos grupos funcionais de uma molécula pode influenciar na sua atividade biológica, neste composto foi observado modificações no anel dihidropiperidinona, onde foi feita a substituição por piperidinil, essa modificação pode ter promovido a perda da atividade biológica, diminuindo a interação com as enzimas do parasita e promovendo uma diminuição da atividade biológica [36]

O composto 14b e 19a, apresentam densidades eletrônicas parecidas, de acordo com o valor do momento dipolo, que estão próximas da densidade eletrônica da pipartina, a molécula 19a, apresenta dupla ligação entre os anéis que sofreram modificações, bem como foi observado uma alteração na cadeia alifática entre estes dois anéis. O composto 14b sofreu uma modificação dihidropiperidinona sendo substituído por um anel piperidinil e na porção trimetoxibenzeno a substituição por um anel benzodioxol anulou a atividade esquistossomicida deste derivado. Estes compostos apresentam densidade eletrônica alta e quase próxima da pipartina, mas são compostos grandes e volumosos quando comparada ao seu protótipo, o que pode explicar a falta de interação com enzimas e receptores de canais iônicos no parasita promovendo a perda da atividade biológica contra o *S.mansoni* quando comparada a pipartina, onde a pipartina em baixas concentrações promove alteração do tegumento do parasita. O composto 14b apresenta dupla ligação entre as duas porções que sofreram alteração aumentando a distância entre os dois anéis que formam o composto, esta distância pode ter influenciado na perda desta atividade biológica.

O composto 1m e 6b apresentam densidades eletrônicas quase próximas da pipartina de acordo com a tabela 1, que mostra os valores momento dipolo, mas não apresentaram atividade biológica contra o parasita *S.mansoni*, a perda desta atividade pode estar relacionada com o tamanho destas moléculas que são grande, que não é possível a ligação com enzimas que estão no tegumento, não sendo capaz de promover modificações na membrana do tegumento do parasita, o que não provoca alterações no tegumento e conseqüentemente não há morte do parasita. O composto 1m a porção dihidropiperidinona foi substituída pelo anel trimetoxibenzeno e a porção trimetoxibenzeno foi substituída pelo anel dicyclohecy, essa mudança da posição do anel trimetoxibenzeno, pode influenciar na resposta biológica, pois este

composto teve perda da sua atividade contra o parasita. O composto 6b teve a porção do trimetoxibenzeno substituída pelo anel dicyclohexyl, como o composto 1m, o que essa alteração como apresentando anteriormente pode promover a perda da atividade contra o parasita *S.mansoni*, quando comparada a piplartina, pois estes dois compostos que tiveram esta mesma alteração perdeu a atividade biológica.

Vários estudos já demonstram a atividade esquistosomicida da piplartina, mas não se sabe o seu real mecanismo de ação [10], é necessário estudos para conhecer a sua relação química com atividades biológicas e dos seus análogos, isso é importante para descoberta de novos protótipos a partir da piplartina. Uma substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo funcional diferente como: metoxila, nitro, halogênio e dentre outros pode alterar a atividade biológica, podendo essa alteração promover mudanças na duração e a natureza do efeito farmacológico, mudanças nas características físico-químicas da moléculas, contribuindo para a produção de novas moléculas. A partir deste estudo pode ser observado que alguns grupos funcionais são importantes para promover a atividade esquistosomicida, onde os análogos que sofreram modificação e perderam a atividade, aquele grupo funcional particular que tenha sido removido ou alterado é de grande importância para a atividade biológica e citotoxicidade do composto [37].

De acordo com a toxicidade em células de fibroblastos de murino, a piplartina apresentou toxicidade nas concentrações testadas e os compostos 1G e 14B apresentaram toxicidade nas concentrações de 200, 400 e 800 µg/ml, o que não foi observado nos demais derivados. De acordo com a tabela 2 os parâmetros de solubilidade, estes compostos apresentam valores próximos a da piplartina e de acordo com a tabela 3, estes compostos sintéticos apresentam valores próximos com a piplartina, o que explica toxicidade dos compostos 1G e 14B. Da mesma forma, o teste de citotoxicidade em células de macrófagos murino por citometria de fluxo mostrou toxicidade para células de mamífero mais expressivas quanto à piplartina do que os análogos. Por outro lado, observou-se uma redução notável da citotoxicidade mediada pela solução do veículo DMSO nas células tratadas com piplartina e análogos, indicando não apenas que as moléculas diminuíram o efeito tóxico sobre células de mamíferos, mas também tiveram algum efeito protetor. Esses dados direcionam para mais estudos sobre o desenho racional de moléculas bioativas com baixa toxicidade. A coloração de Annexin-V FITC / PI foi utilizada para

avaliar o mecanismo de morte celular observado no teste de citotoxicidade. A anexina recombinante V conjugada com o fluoróforo FITC identifica a exposição da fosfatidilserina na membrana interna e é para a detecção da fase inicial da apoptose [38], enquanto a PI é uma sonda fluorescente vermelha para o ácido nucleico, que impermeável em células vivas, e detecta células necróticas [39]. Neste estudo, as células J774 tratadas com piplartina e análogos foram mais positivas para coloração com FITC de Annexin-V após 24 h do que para PI, sugerindo que o mecanismo de morte das células tinha relação com a via da apoptose [40].

Estudos mostram que a atividade biológica e toxicológica da pipartina é devido a presença do grupo carbonila α , β insaturado, onde a substituição de qualquer um desses grupos insaturados, promove a formação de uma molécula sem citotoxicidade e perda da atividade biológica [8,41,42]. Pesquisas com este composto propuseram que os grupos α , β insaturado na cadeia alifática presente entre os dois anéis é importante para a atividade biológica contra o parasita *S.mansoni*, mantendo o arranjo conformacional aproximando os dois anéis, onde estas mudanças diminuem a citotoxicidade, podendo isso ser observado nos compostos que foram sintetizados sem a dupla ligação.

Este estudo mostra que as modificações que foram feitas no protótipo para a produção dos derivados, promoveu a perda da atividade esquistosomicida, comprovando que alguns grupos funcionais são essenciais para o gênero, de acordo com a tabela 2, onde são demonstrados as propriedades funcionais e moleculares, a síntese empregada promove alteração no arranjo conformacional, no equilíbrio hidrófilo-lipófilo e na distribuição da densidade eletrônica quando comparada a piplartina. Dentre as porções modificadas a trimetoxibenzeno e a instauração na cadeia alifática são as partes mais sensíveis, pois a alteração do radical metoxila na posição meta do anel aromático, promove perda da atividade esquistosomicida e conseqüentemente reduz a toxicidade.

4. Conclusão

Este estudo demonstrou que os análogos da piplartina, quando comparado a esta molécula, apresentou perda da atividade contra o parasita *S.mansoni*, mas conseqüentemente os análogos apresentaram diminuição da toxicidade quando comparada a piplartina. Foi possível observar que as alterações no anel

trimetoxibenzeno, na instauração da cadeia alifática e no anel dihidropiperidinona, são altamente sensíveis as modificações, promovendo perda da atividade biológica, com diminuição da toxicidade, mostrando que moléculas análogas, da mesma série não apresenta propriedades físico-químicas e atividade biológica semelhantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES / FAPEPI pela bolsa concedida. A ACM agradece a FAPESP (2014 / 02282-6). A YPM agradece ao CNPq (Grant 302674 / 2010-1). O trabalho na UCIBIO / Requite foi apoiado pelo trabalho também foi apoiado pela Fundação para uma Ciência e Tecnologia (FCT) pela concessão no. UID / MULTI / 04378/2013 - POCI / 01/0145 / FEDER / 007728 com apoio financeiro da FCT / MEC através de fundos nacionais e co-financiados pela FEDER, nos termos do Acordo de Parceria PT2020.

Material Suplementar

Tabela S1. Efeitos in vitro de compostos contra *Schistosoma mansoni* de 49 dias de idade.

Grupo	Periodo de incubação (h)	Vermes mortos (%) ^a		Redução atividade motora (%) ^a			
				Slight		Significant	
		M	F	M	F	M	F
Controle ^b	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 2 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Amida Piplartina 10 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100

	72	100	100	0	0	100	100
	96	100	100	0	0	100	100
5 μ M	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
	96	60	60	0	0	60	60
Amida 1G	24	0	0	0	0	0	0
50 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
25 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
10 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
5 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
Amida 1M	24	0	0	0	0	0	0
50 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
25 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
10 μ M	24	0	0	0	0	0	0

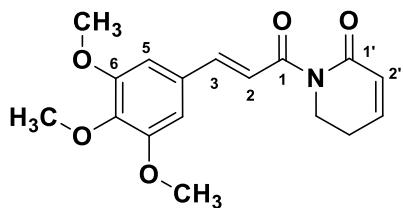
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
5 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
<hr/>							
Amida 6B	24	0	0	0	0	0	0
50 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
25 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
25 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
10 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
5 μ M	14	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
<hr/>							
Amida 14B	24	0	0	0	0	0	0
50 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0

25 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
10 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
5 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
Amida 19A		24	0	0	0	0	0
50 μ M	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
25 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
10 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0
5 μ M	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0	0

S2. Descrição da piplartina e seus analógos

Piplartina, IUPAC nome:

1-[(2E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]-1,2,5,6-tetrahydropyridin-2-one



RMN¹ H (300 MHz; CDCl₃): δ 7,68 (d; *J*=15,6 Hz; 1H, H2) ; 7,43 (d; *J*=15,6 Hz; 1H, H3); 6,95 (m, 1H, H2'); 6,81 (s, 2H, H5 e H9); 6,04 (dt; *J*= 9,9 e 1,8 Hz; 1H; H3'); 4,05 (t; *J*= 6,5 Hz; 2H; H5'); 3,89 (s, 6H; OMe 6 e 8) 3,88 (s; 3H; OMe 7); 2,50 (m; 2H, H4').

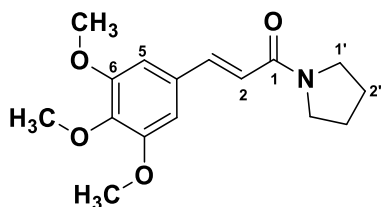
RMN¹³ C (75 MHz; CDCl₃): δ 168,70 (C1); 165,80 (C1'); 153,30 (C6, C8); 145,50 (C3'); 143,70 (C4); 139,90 (C7); 130,60 (C3); 125,70 (C2'); 121,00 (C2); 105,40 (C5, C9); 60,89 (OMe 7); 56,11 (OMe 6 e 8); 41,62 (C5'); 24,70 (C4').

EMBR- *m/z* (%): 317 (M⁺, 90), 289 (20), 274 (32), 221 (100), 205 (20), 190 (32), 177 (17).

EMAR (IES): calculado para C₁₇H₂₀NO₅⁺[M+H]⁺= 318,1336; encontrado= 318,1337.

1G, IUPAC nome:

(2E)-1-(pyrrolidin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one



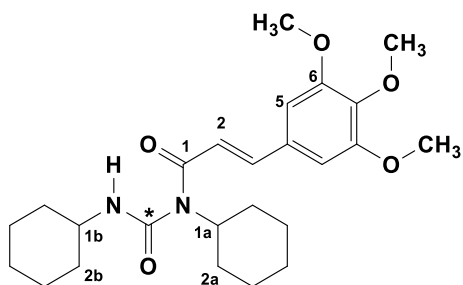
RMN¹ H (300 MHz; CDCl₃): δ 7,62 (d; *J*=15,3 Hz; 1H; H3); 6,75 (s, 2H, H5, H9); 6,62 (d; *J*= 15,3 Hz; 1H; H2); 3,89 (s, 6H; OMe 6 e 8); 3,87 (s, 3H, OMe 7); 3,65-3,60 (m, 4H, H1', H4'); 2,01 (m, 2H, H2'); 1,91 (m, 2H, H3').

RMN¹³ C (75 MHz; CDCl₃): δ 164,52 (C1); 153,25 (C6, C8); 141,64 (C3); 139,40 (C7); 130,80 (C4); 117,98 (C2); 104,95 (C5, C9); 60,82 (OMe 7); 56,07 (OMe 6 e 8); 46,51 (C1'); 45,96 (C4'); 26,02 (C2'); 24,23 (C3').

EMAR (IES): calculado para C₁₆H₂₂NO₄⁺[M+H]⁺= 292,1543 ; encontrado= 292,1539 .

1M, IUPAC nome:

1,3-dicyclohexyl-1-[(2E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]urea



RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 7,57 (d; $J= 15,5$ Hz; 1H; H2); 6,70 (s, 2H; H5, H9); 6,62 (d; $J= 15,5$ Hz; 1H; H3); 4,16 (m, 1H, H1b); 3,88 (s, 6H; OMe 6 e 8); 3,86 (s, 3H, OMe 7), 3,76 (m, 1H, H1a); 2,02-1,82 (m, 8H, H2a, H2b, H6a, H6b), 1,41-1,15 (m, 12H; H3a, H3b, H4a, H4b, H5a, H5b).

RMN ^{13}C (100 MHz; CDCl_3): δ 165,89 (C1); 154,05 (C*); 153,35 (C6, C8); 143,08 (C3); 139,88 (C7); 130,18 (C4); 118,64 (C2); 105,02 (C5, C9); 60,90 (OMe 7); 55,99 (OMe 6 e 8); 55,49 (C1b); 49,98 (C1a); 34,87 (C2b); 33,90 (C6b); 32,77 (C2a); 30,86 (C6a); 26,15 (C3b, C5b); 25,37 (C3a); 25,34 (C5a); 24,67 (C4a, C4b).

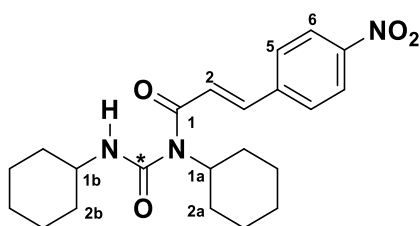
EMBR- m/z (%): 319 (40), 236 (100), 222 (55), 221 (50), 207 (32), 194 (25), 190 (30), 180 (27), 163 (20), 133 (21), 121 (20), 98 (45), 77 (20), 68 (20), 55 (25).

EMAR (IES): calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 445,2697$; encontrado= 445,2725.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3291, 2997, 2931, 2854, 2249, 2118, 1761, 1703, 1650, 1583, 1330, 1129, 1006, 973, 892, 822.

6B, IUPAC nome:

1,3-dicyclohexyl-1-[(2E)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-enoyl]urea



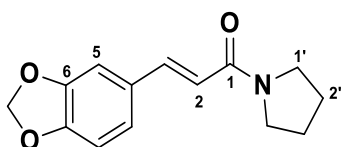
RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): δ 8,24 (d; $J=9,0$ e 2,4 Hz; 2H, H6, H8); 7,69 (d; $J=15,3$ Hz; 1H, H2); 7,62 (d; $J=9,0$ e 2,1 Hz; 2H, H5, H9); 6,84 (d; $J=15,3$ Hz; 1H, H3); 6,55 (sl, NH); 4,19-4,11 (m, 1H, H1b); 3,82-3,74 (m, 1H, H1a); 1,89-1,19 (m, 20H, H2a, H2b, H3a, H3b, H4a, H4b, H5a, H5b, H6a, H6b).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 165,16 (C1); 153,66 (C*); 148,28 (C7); 140,92 (C4); 140,23 (C3); 128,41 (C5, C9); 124,19 (C6, C8); 123,61 (C2); 55,73 (C1a); 50,05 (C1b); 34,89 (C2a, C6a); 32,78 (C2b); 31,00 (C6b); 26,16 (C3a); 25,42 (C3b); 25,35 (C4a); 25,30 (C4b); 24,66 (C5a, C5b).

EMAR (IES): calculado para $C_{22}H_{30}N_3O_4$: $[M+H]^+ = 400,2231$; encontrado = 400,2236.

14B, IUPAC nome:

(2E)-3-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(pyrrolidin-1-yl)prop-2-en-1-one



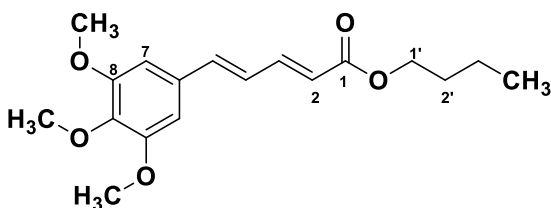
RMN 1H (300 MHz; $CDCl_3$): δ 7,61 (d; $J = 15,3$ Hz; 1H, H3); 7,04 (d; $J = 1,5$ Hz; 1H, H5); 7,02-6,99 (dd; $J = 8,4$ e $1,8$ Hz; 1H, H9); 6,80 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H, H8); 6,56 (d; $J = 15,3$ Hz; 1H, H2); 5,99 (s, 2H, OCH_2O); 3,63-3,56 (m, 4H, H1', H4') 2,04-1,98 (m; 2H, H2'); 1,94-1,87 (m, 2H, H3').

RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$): δ 164,76 (C1); 148,84 (C6); 148,10 (C7); 141,30 (C3); 129,68 (C4); 123,75 (C9); 116,82 (C2); 108,41 (C8); 106,32 (C5); 101,32 (OCH_2O); 46,47 (C1'); 45,95 (C4'); 26,07 (C2'); 24,28 (C3').

EMAR (IES): calculado para $C_{14}H_{16}NO_3$: $[M+H]^+ = 246,1125$; encontrado = 246,1130.

Amida 19A IUPAC nome:

Butyl (2E,4E)-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)penta-2,4-dienoate



RMN 1H (300 MHz; $CDCl_3$): δ 7,42 (qd; $J = 15,5$ e $8,9$ Hz; 1H, H3); 6,81 (sl, 1H, H5); 6,78 (sl, 1H, H4); 6,69 (s, 2H, H7, H11); 5,99 (d; $J = 15,3$ Hz; 1H, H2); 4,18 (t, $J = 6,8$ Hz; 2H, H1'); 3,90 (s, 6H; OMe 8, 10); 3,87 (s, 3H; OMe 9); 1,72-1,63 (m, 2H, H2'); 1,49-1,39 (m, 2H, H3'); 0,96 (t, $J = 7,4$ Hz; 3H, H4').

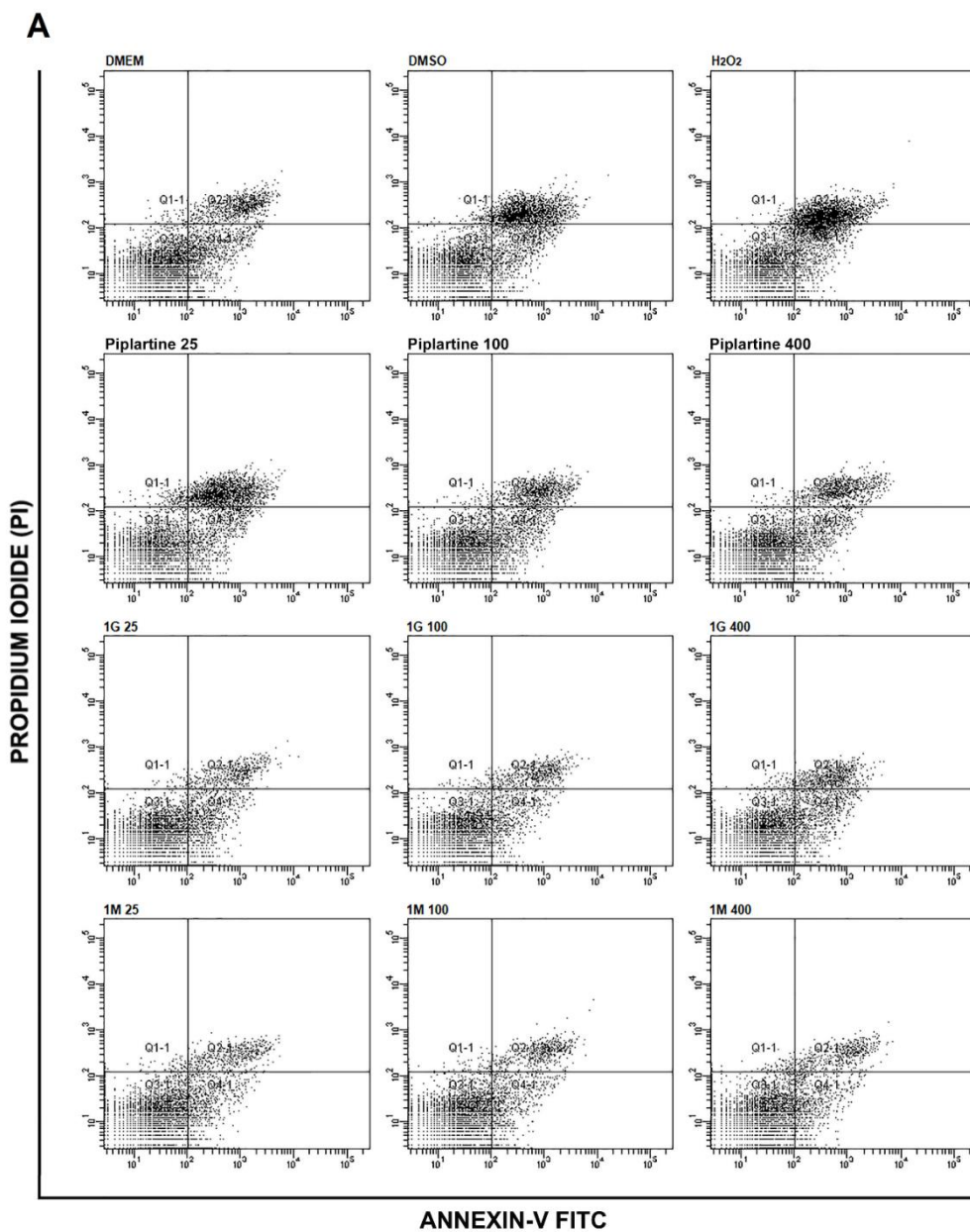
RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$): δ 167,11 (C1); 153,37 (C8, C10); 144,30 (C3); 140,21 (C5); 139,10 (C9); 131,62 (C2); 125,64 (C6); 121,03 (C4); 104,26 (C7, C11); 64,22 (C1'); 60,91 (OMe 9); 56,10 (OMe 8, 10); 30,73 (C2'); 19,15 (C3'); 13,70 (C4').

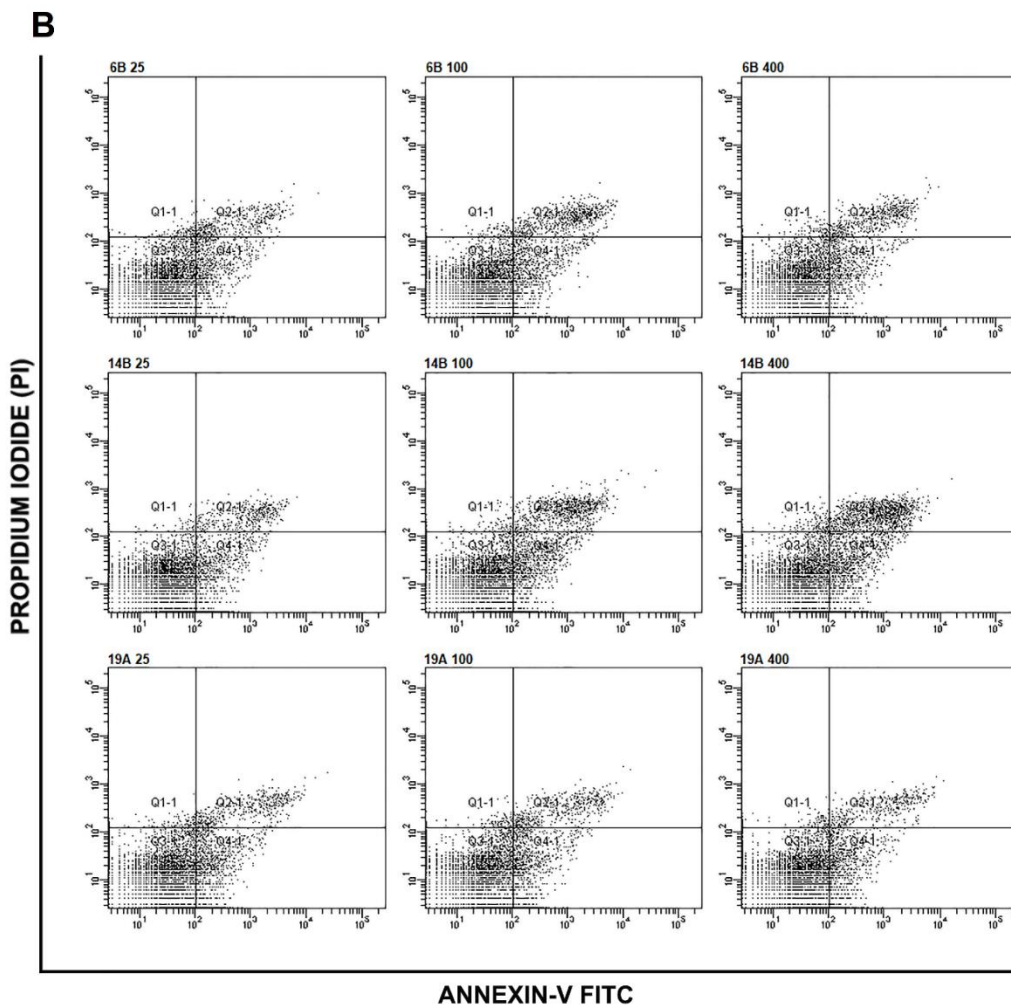
EMBR- m/z (%): 320 (25), 219 (100), 204 (30), 188 (55).

EMAR (IES): calculado para $C_{18}H_{24}NaO^+$: $[M+Na]^+ = 343,1516$; encontrado = 343,1513

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3445, 3005, 2960, 2897, 2838, 1703, 1624, 1579, 1506, 1467, 1419, 1357, 1253, 1244, 1142, 998, 850, 744, 724.

S3. Células de macrófagos de murino (J774), analisadas por citometria de fluxo (20.000 eventos / amostra) para avaliar o mecanismo de morte celular mediado pela piplartina e os análogos 1G e 1M (placa A), 6B, 14B e 19A (placa B) após o tratamento para 24 h a concentrações de 25, 100 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ usando marcação de anexina-V FITC (marcador de apoptose) e iodeto de propídio (marcador PI, necrose). Os controles DMEM, DMSO e H_2O_2 foram utilizados como parâmetros de comparações.





REFERÊNCIAS

- 1 Nascimento, G.L.; DE OLIVEIRA, M.R.F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Transac. of The Royal Society of Trop. Medic. and Hygiene*, **2014**,108,29-36, DOI: 10.1093/trstmh/trt109.
- 2 OMS – Organização Mundial da Saúde. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases 2010a. Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/ Acesso:27 de agosto de 2017.
- 3 Guimarães, M.A.; Campelo, Y.D.M.; Vêras, L.M.C.; Colhone, M.C.; Lima, D.F.; Ciancaglini, P.; Kuckelhaus, S.S.; Lima, F.C.A.; de Moraes J.; Leite, J.R. de

- S.A. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, 14, 4519–4528, Doi:10.1166/jnn.2014.8248.
- 4 Cioli, D.; PICA – MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A..Schistosomiasis Control: praziquantel forever? *Molecul & Biochemi Parasitol.* **2014**, 195, 23-29, 10.1016/j.molbiopara.2014.06.002.
 - 5 Melman, S.D.; Steinauer, M.L; Cunningham, C.; Kubatko L.S.; Mwangi I, N.; Wynn N.B.; Mutuku, M. W.; Karanja D. M. S.; Colley, D. G.; Black, C. L.; Secor W. E.; Mkoji G. M.; Loker , E. S. Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. *Plos Neglected Tropical Diseases.* **2009**, 3, p.e504, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000504.
 - 6 BARBOSA DE CASTRO, C.C.; DIAS, M.M.; PESSOA DE REZENDE, T.; MAGALHÃES, L.G.; DA SILVA FILHO, A.A. Chapter 8 – Natural Products With Activity Against *Schistosoma* Species. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. M.K.R.V.Kon.San Diego, Academic Press. 2013,109-134.
 - 7 Parmar, V.S.;Jain, S.C.;Bisht, K.S.;Jain, R.; Taneja, P.;Jha, A.;Tyagi, O.M.;Prasad, A.K.;Wengel, J.Olsen, C.E.;Boll, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry.* **1997**, 46, 597–673.
 - 8 Bezerra, D.P.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; Saker-Neto, N.; Silveira, E.R.; Costa Lotufo, L.V.Overview of the therapeutic potential of pipartine (Piperlongumine). *Eur J Pharm Sci.* **2013**, 48, 453–463, DOI: 10.1016/j.ejps.2012.12.003.
 - 9 Raj, L.; Ide, T.;Gurkar, A.U.;Foley, M.;Schenone, M.; Li,X.;Tolliday, N.J.;Golub, T.R.; Carr, S.A.; Shamji, A.F. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature.* **2011**, 475, 231–234, DOI: 10.1002/mc.22351.
 - 10 de Moraes, J.; Nascimento,C.; Lopes,P.O.M.V.; Nakano, E.; Yamaguchi,L.F.; Kato, M.J.; Kawano,T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine.*Exp. Parasitol.* **2011**, 127,357–364. doi:10.1016/j.exppara.2010.08.021.
 - 11 Adams, D.J.;Dai,M.;Pellegrino G.;Wagner, B.K.;Stern, A.M.;Shamji, A.F.;Schreiber, S.L. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of

- piperlongumine analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2012**, 109, 15115–15120, DOI: 10.1073/pnas.1212802109
- 12 Rao, V.R.; Muthenna, P.; Shankaraiah, G.; Akileshwari, C.; Babu, K.H.; Suresh, G.; Babu, K.S.; Chandra Kumar, R.S.; Prasad, K.R.; Yadav, P.A. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). *Eur J Med Chem*. **2012**, 57, 344–361, DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.09.014.
- 13 Campelo, Y. D. M.; Mafud, A.C.; Vêras, L. M. C.; Guimarães, M. A.; Yamaguchi, L. F.; Lima, D. F.; Arcanjo, D. D. R.; Kato, M. J.; Mendonça, Pinto, R. Z. P. L.S. Mascarenhas, Y. P.; Silva, M. P. N.; de Moraes, J.; Eaton, P.; Leite, J. R. S. Synergistic effects of in vitro combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2017**, 88, 488–499, DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.057](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.057).
- 14 Fokoue, H.H. Síntese, atividades biológicas e estudo de relação de estrutura-atividade de piperamidas. [Internet]. **2015**. São Paulo. [Cited 2017 August 27]. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-25032015-105445/pt-br.php>
- 15 Houghton, P.J.; Howes, M.J.; Lee, C.C.; Steventon, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*. **2007**, 110, 391–400, DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.032.
- 16 PHARMACEUTICAL BIOLOGY. **2017**, 55, 1601–1607.
- 17 Adams, D.J.; Dai, M.; Pellegrino, G.; Wagner, B.K.; Stern, A.M.; Shamji, A.F.; Schreiber, S.L. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2012**, 109, 15115–15120, DOI: 10.1073/pnas.1212802109
- 18 *J. Braz. Chem. Soc*. **2010**, 21, 1807–1813.
- 19 Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A. et al. Gaussian 09, Rev A.1, Gaussian, Inc, USA. Available online at: www.gaussian.com (accessed 22 jun 2017) (2009).
- 20 Lee, C.; Yang, Parr, W. R. Development of the colle-salveti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Phys. Rev. B*. **1988**, 37, 785e789.

- 21 Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous electron gas, *Phys. Rev.*, **136**, B864 (1964).
- 22 Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA—an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des.* **2004**, *18*, 167–173.
- 23 Pires, D.E.V.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem.* **2015a**, *58*, 4066–4072. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- 24 Pires, D.E.V.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. Theory—how to interpret pkCSM results. University of Cambridge. **2015b**, <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkcsm/theory>
- 25 Śliwka, L.; Wiktorska, K.; Suchocki, P.; Milczarek, M.; Mielczarek, S.; Lubelska, K. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS ONE.* **2016**, *11*, e0155772. doi:10.1371/journal.pone.0155772.
- 26 Keiser, J.; Ingram, K.; Vargas, M.; Chollet, J.; Wang, X.; Dong, Y.; Vennerstrom, J.L. In vivo activity of aryl ozonides against *Schistosoma* species, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1090–1092. DOI: 10.5772/27740
- 27 de Moraes, J.; de Oliveira, J., R.N.; Costa, J.P.; Junior, A.L.; de Sousa, D.P.; Freitas, R.M.; Allegretti, S.M.; Pinto, P.L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014**, *8*, e2617. doi: 10.1371/journal.pntd.0002617.
- 28 Mafud, A.C.; Silva, M.P.; Monteiro, D.C.; Oliveira, M.F.; Resende, J.G.; Coelho, M.L.; de Sousa, D.P.; Mendonça, R.Z.; Pinto, P.L.; Freitas, R.M.; Mascarenhas, Y.P.; de Moraes, J. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite, *Chem Biol Interact.* **2016**, *244*, 129–139. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.003.
- 29 Moraes, J.; Nascimento, C.; Yamaguchi, L.F.; Kato, M.J.; Nakano, E. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132*,

- 222–227. doi:10.1016/j.exppara.2012.07.004.
- 30 Pink, R.; Hudson, A. Mouries, M.A.; Bendig, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat.Rev.Drug.Discov.* **2005**, 4, 727-740, DOI: 10.1038/nrd1824.
- 31 Abdulla, M.H.; Ruelas, D.S.; Wolff, B. Snedecor, J.; Lim, K.C.; Xu, F.; Renslo, A.R.; Williams, J.; McKerrow, J.H.; Caffrey, C.R. Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening. *PLoS Negl Trop Dis.* **2009**, 14, 1-14, doi: 10.1371/journal.pntd.0000478.
- 32 Keiser, J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology.* **2010**, 137, 589-603, DOI: 10.1017/S0031182009991739.
- 33 Ramirez, B.; Bickle, Q.; Yousif F.; Fakorede, F. Mouries, M.A.; Nwaka, S. Schistosomes: Challenges in compound screening. *Exp Opin on Drug Discov.* **2007**, 2, 53-61. DOI: 10.1517/17460441.2.S1.S53.
- 34 McVeigh, P.; Atkinson, L.; Marks, N.J.; Mousley, A.; Dalzell, J.J.; Sluder, A.; Hammerland, L.; Maule, A.G. Parasite neuropeptide biology: Seeding rational drug target selection? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **2011**, 15, 76-91, DOI: 10.1016/j.ijpddr.2011.10.004.
- 35 Cioli, D.; Pica-Mattoccia, L.; Archer, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? *Pharmacology & therapeutics.* **1995**, 68, 35-85, doi.org/10.1016/0163-7258(95)00026-7.
- 36 Uretsky, N.; Robertson, Larry. Academic preparation for modern drug Discovery. *ScienceCareers.org.* **2004**, 1-3.
- 37 Lill, M.A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. *Drug Discov Today.* **2007**, 12, 1013-1017, DOI: 10.1016/j.drudis.2007.08.004.
- 38 Jain, M.V.; Paczulla, A.M.; Klonisch, Thomas.; Dimgba, F.N.; Rao, S.B.; Roberg, Karin.; Schweizer, F.; Lengerke, C.; Davoodpour, P.; Palicharla, V.R.; Maddika, S.; Łos, M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of Cell and Molecu Medici.* **2013**, 17, 12-29, DOI: 10.1111/jcmm.12001.
- 39 Atale, N.; Gupta, Yadav, S. U.C.S.; Rani, V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy.* **2014**, 255, 7-19, DOI: 10.1111/jmi.12133.

- 40 Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N. et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. **2014**, 19: 555, DOI: 10.1007/s10495-014-0967-2
- 41 Bezerra, D.P.; de Castro, F.O.; Alves, A.P.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Elmiro, F.J.; de Alencar, N.M.; Mesquita, R.O.; Lima, M.W.; Costa-Lotufo, L.V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of App Toxicol*.**2008**, 28, 156–163,DOI: 10.1002/jat.1261.
- 42 Ponte-Sucre, A.; Bruhn, H.; Schirmeister, T.; Cecil, A.; Albert, C.R.; Buechold, C.; Tischer M.; Schlesinger, S.; Goebel, T.; Fuß, A.; Mathein, D.; Merget, B.; Sotriffer, C.A.; Stich, A.; Krohne, G.; Engstler, M.; Bringmann, G.; Holzgrabe, U. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res*. **2015**, 18, 703-711, DOI: 10.1007/s00044-008-9161-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Mecanismo de ação da atividade resultante destas interações entre piplartina/epiisopiloturina/praziquantel;
- Avaliação do sinergismo in vivo entre alcaloides oriundos do jaborandi (*Pilocarpus micropyllus*) e a droga de referência praziquantel contra o parasita *S.mansoni*;
- Avaliação do sinergismo in vivo entre alcaloides oriundos do jaborandi (*Pilocarpus micropyllus*) e a piplartina contra o parasita *S.mansoni*
- Estudos do efeito in vivo, ensaios pré-clínicos, visando analisar a carga parasitária em camundongos submetidos ao tratamento com os compostos ou fármacos selecionados na triagem in vitro; Abordagem: usar diferentes esquemas terapêuticos, sobretudo administrados via oral e verificar a carga parasitária, as massas dos órgãos (fígado e baço) e oograma quantitativo, além de análises histopatológicas;
- Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade in vivo da associação entre os alcaloides imidazólicos do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e a droga praziquantel.

APÊNDICE



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

Synergistic effects of *in vitro* combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*



Yuri Dias Macedo Campelo^{a,b}, Ana Carolina Mafud^c, Leiz Maria Costa Vêras^a, Maria Adelaide Guimarães^{a,d}, Lydia F. Yamaguchi^e, David Fernandes Lima^{a,f}, Daniel Dias Rufino Arcaño^a, Massuo J. Kato^e, Ronaldo Z. Mendonça^g, Pedro Luiz Silva Pinto^h, Yvonne Primerano Mascarenhas^c, Marcos P.N. Silvaⁱ, Josué de Moraesⁱ, Peter Eaton^{a,j}, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{a,k,*}

^a Biodiversity and Biotechnology Research Center, Biotec, Federal University of Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, 64202020, Brazil

^b Institute of Higher Education of Vale do Parnaíba, FAHESP/IESVAP, Parnaíba, PI, Brazil

^c São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^d Phytobios Nordeste LTDA, Centroflora Group, Parnaíba, PI, Brazil

^e Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^f Federal University of Vale do São Francisco, Paulo Afonso, BA, Brazil

^g Laboratory of Parasitology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil



1 (Article.)

2 **Structure-function relationship activity of piplartine and synthetic analogues against**
3 **Schistosoma mansoni**

4

5 Yuri Dias Macedo Campelo^{1,2,3}, Alicia Ombredane⁴, Andreanne G. Vasconcelos⁵, Lucas F. F.
6 Albuquerque⁶, Daniel C. Moreira⁵, Alexandra Placido⁷, Ana Lydia⁸, Ana Carolina Mafud^{9,10},
7 Yvonne P. Mascarenhas⁹, Cristina Delerue-Matos⁷, Tatiana K. S. Borges⁶, Graziella A.
8 Joanitti⁴, Daniel Arcanjo¹¹, Massuo J. Kato⁸, Selma S. Kucklhaus⁵, Josué Moraes¹², Jose
9 Roberto S.A. Leite^{5,*}

10

11 ¹Biodiversity and Biotechnology Research Center, Biotec, Federal University of Piauí, UFPI,
12 Parnaíba, PI, 64202020, Brazil,

13 ²Graduate Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point Federal University of Piauí,

ANEXOS

Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity

Maria A. Guimarães^{1,2}, Yuri D. M. Campelo^{1,2}, Leiz M. C. Vêras^{1,3}, Marcelle C. Colhone⁴, David Fernandes Lima^{3,5}, Pietro Ciancaglini⁴, Selma S. Kuckelhaus⁶, Francisco C. A. Lima^{3,7}, Josué de Moraes⁸, and José Roberto de S. A. Leite^{1,*}

¹Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Campus Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, 6420202, Brazil

²Programa de Mestrado em Biotecnologia, PPGBiotec, Campus Parnaíba, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, 6420202, Brazil

³Programa de Doutorado Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, UFPI, PI, 64049550, Brazil

RESEARCH ARTICLE

Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*

Maria A. Guimarães¹, Rosimeire N. de Oliveira², Leiz M. C. Vêras^{1,3}, David F. Lima^{1,3,4}, Yuri D. M. Campelo^{1,3}, Stefano Augusto Campos¹, Selma A. S. Kuckelhaus⁵, Pedro L. S. Pinto⁶, Peter Eaton⁷, Ana C. Mafud⁸, Yvonne P. Mascarenhas⁸, Silmara M. Allegretti², Josué de Moraes⁹, Aleksandar Lolić¹⁰, Tatjana Verbić¹⁰, José Roberto S. A. Leite^{1,*}



1 Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil, 2 Department of Animal Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, 3 Graduate Program in Biotechnology, RENORBIO, Focal Point Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil, 4 Collegiate Academic Medicine, Federal University of São Francisco Valley, Campus Paulo Afonso, Paulo Afonso, Bahia, Brazil, 5 Faculty of Medicine, University of Brasília, UNB Campus Dacy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brazil, 6 Adolfo Lutz Institute, Central Laboratory, São Paulo, Brazil, 7 UCIBIO, REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of Porto, Portugal, 8 Group of Crystallography, Institute of Physics of São Carlos, University of



[Purchase PDF](#)

Antileishmanial and Immunomodulatory Effects of Dermaseptin-01, A Promising Peptide Against *Leishmania amazonensis*

Author(s): Renata X. Chaves, Patrick V. Quelemes, Luciana M. Leite, Daniela S.A. Aquino, Layane V. Amorim, Klínger A.F. Rodrigues, Yuri D.M. Campelo, Leiz M.C. Veras, Marcelo P. Bemquerer, Joilson Ramos-Jesus, Daniel D.R. Arcanjo, Fernando A.A. Carvalho, Selma A.S. Kückelhaus, Jose R.S.A. Leite*.

Journal Name: Current Bioactive Compounds

Volume 13 , Issue 4 , 2017

DOI : 10.2174/1573407212666161014131415

[Journal Home](#)

Graphical Abstract:



Antipromastigotes
(Antileishmania)