



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Avaliação terapêutica *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphyllus* para esquistossomose**

Maria Adelaide Guimarães

Parnaíba – PI

2018

MARIA ADELAIDE GUIMARÃES

**Avaliação terapêutica *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphyllus* para esquistossomose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia.

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

Parnaíba – PI

2018


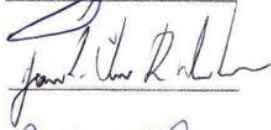



## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: MARIA ADELAIDE GUIMARAES

TÍTULO DO PROJETO: "Avaliação terapêutica in vivo dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphyllus* para esquistossomose."

PROFESSOR ORIENTADOR: Jose Roberto de Souza de Almeida Leite

**BANCA EXAMINADORA:**

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Jose Roberto de Souza de Almeida Leite - UFPI (Presidente)	APROVADO	
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI (Examinador)	APROVADO	
Profa. Dra. Durcilene Alves Da Silva - UFPI (Examinadora)	APROVADO	
Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras – UFPI (Examinadora)	APROVADO	
Prof. Dr. Jilson Ramos De Jesus - UFPI (Examinador)	APROVADO	

DATA DA AVALIAÇÃO: 18 de Janeiro de 2018.

HORÁRIO: 14:30h

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

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

G963a Guimarães, Maria Adelaide.

Avaliação terapêutica *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphylus* para esquistossomose [manuscrito] / Maria Adelaide Guimarães. – 2018.

123 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Tese (Doutorado em Biotecnologia RENORBIO/UFPI) - Universidade Federal do Piauí, 2018.

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

1. Produtos Naturais. 2. Jaborandi. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Esquistossômulos. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD: 615.5

Dedico este trabalho a Deus e a minha família pelo amor e apoio incondicional, em especial à minha mãe.

*“O pessimista se queixa do vento, o otimista espera que ele mude e o realista ajusta as velas.”*

**Willian George Ward.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado nesta jornada e por ter me dado determinação para chegar até aqui.

A toda minha família, em especial, a minha mãe Maria Heronilba Guimarães, uma mulher guerreira que me criou com muita fibra passando por todas as dificuldades sempre com muito amor, carinho e extrema dedicação. Agradeço pelo seu apoio, incentivo, pelas orações, pelas renúncias e pelos sacrifícios feitos por mim. A minha madrinha Aldecir Mendes, por ter lutado comigo nesta jornada, pelo exemplo de vida, honestidade e por seus conselhos que sempre me ajudaram a ultrapassar os obstáculos que apareceram no meu caminho. Ao meu irmão Lucas pelo companheirismo e compreensão.

A todos os amigos que compõem o Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia –BIOTEC que direta ou indiretamente compartilharam alguns momentos científicos comigo. Em especial, ao meu orientador professor Dr. José Roberto Leite pela oportunidade valiosa que me concedeu, pelos conselhos e amizade, obrigada por dedicar seu tempo e sua sabedoria para que minha formação fosse um aprendizado de vida. A Leiz Veras pela dedicação, carinho, paciência e confiança. Ao Dr. Josué de Moraes pelos conhecimentos compartilhados e por ter acreditado no meu compromisso com o trabalho.

Ao grupo Centroflora, em especial a empresa Phytobios na pessoa da Dra. Cristina Dislich Ropke e Dra. Tania Sawada pela parceria diante deste projeto e pelo financiamento durante toda a pesquisa.

A todas as universidades parceiras e colaboradores que me ajudaram no desenvolvimento do projeto. Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, na pessoa da Dra. Yvonne Mascarenhas e Dra. Ana Mafud, a Universidade de Brasília na pessoa da Dra. Selma Kuckelhaus, Ana Luiza Vieira, Rayane Ganassin e Luis Alexandre Muehlmann, a Universidade Estadual de Campinas na pessoa da Dra. Silmara Allegretti e Rosimeire Oliveira, a Universidade do Porto na pessoa do Dr. Peter Eaton e ao Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas da Universidade de Guarulhos.

E finalmente agradecer as agências de fomento CNPq, FAPESP e FAPEPI, bem como a Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de iniciar na pesquisa.

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença grave e atualmente estima-se que afete mais de 207 milhões de pessoas no mundo todo. Devido ao uso intensivo do praziquantel, há uma crescente preocupação com o desenvolvimento de cepas resistentes ao medicamento. Portanto, é necessário a busca e investigação por novos compostos com potencial efeito esquistossomicida. Atualmente essa busca vem sendo feita principalmente a partir de produtos oriundos de plantas, assim, a pesquisa de novos fármacos esquistossomicidas levou ao estudo de substâncias naturais, tais como curcumina, fitol, epiisopiloturina e epiisopilosina. O foco do presente trabalho foi principalmente em epiisopiloturina e epiisopilosina que são alcaloides extraídos de *Pilocarpus microphyllus*, cuja atividade *in vitro* contra *S. mansoni*, já foi relatada. O capítulo I apresenta uma breve revisão sobre produtos naturais, em especial, sobre alcaloides de uma forma geral e os que estão presentes na espécie *P. microphyllus* (principalmente epiisopiloturina e epiisopilosina) e sobre a esquistossomose. No capítulo II verificamos o efeito *in vivo* da epiisopiloturina (EPI) contra vermes adultos e jovens de *S. mansoni*. Neste estudo, os camundongos (Balb/C) foram tratados com EPI por via oral 21 dias pós-infecção (formas jovens) com as doses de 40 e 300 mg/kg e 45 dias pós-infecção (forma adulta) também por via oral com doses únicas de 40, 100 e 300 mg/kg. O tratamento com EPI na dose de 40 mg/kg foi mais eficaz em vermes adultos quando em comparação com doses de 100 e 300 mg/kg. O tratamento com 40 mg/kg em vermes adultos reduziu a carga parasitária significativamente, levando à redução da hepatoesplenomegalia, reduziu a carga de ovos nas fezes e diminuiu o diâmetro dos granulomas. Adicionalmente, o tratamento *in vivo* contra vermes jovens com 40 mg/kg também mostrou uma redução da carga parasitária total. Estudos histopatológicos foram realizados no fígado, baço, pulmão, rim e cérebro e EPI demonstrou ter uma DL50 de 8000 mg/kg. No capítulo III avaliamos o efeito *in vivo* do alcaloide epiisopilosina (EPIIS) contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, além do seu efeito citotóxico, toxicologia *in silico* e toxicologia aguda. Nos testes anti-helmínticos, os camundongos foram tratados com EPIIS 60 dias pós-infecção (vermes adultos) com dose única de 100 e 400 mg/kg por via oral. O tratamento reduziu a carga parasitária significativamente mesmo na menor concentração de 100 mg/kg, levando à redução da hepatoesplenomegalia, e redução dos ovos imaturos. Além disso, o alcaloide mostrou ser bem tolerável nas análises *in silico* e não apresentaram efeitos citotóxicos para as células HaCaT e NIH-3T3 com 512 µg/mL. A avaliação da toxicidade aguda de EPIIS não demonstrou nenhum efeito tóxico na dose de 2000 mg/kg e o tratamento não mostrou diferença significativa nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação ao grupo controle. Em conclusão, os alcaloides testados mostraram potencial para serem utilizados



no tratamento contra esquistossomose, sem demonstrar citotoxicidade e toxicidade aguda aparente.

**Palavras-chaves:** Produtos naturais, jaborandi, *Schistosoma mansoni*, esquistossômulos, toxicidade.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a serious disease and is currently estimated to affect over 207 million people worldwide. Due to the intensive use of praziquantel, there is growing concern with the development of strains resistant to the drug. Therefore, the search and investigation for new compounds with potential schistosomicidal effect is required. This search has been mainly made from products derived from plants. The research of new drugs schistosomicide led to the study of natural substances such as curcumin, phytol, and epiisopiloturine epiisopilosine. This work was had and interested specifically in epiisopiloturine and epiisopilosine that are extracted alkaloid *Pilocarpus microphyllus*, whose *in vitro* activity against *Schistosoma mansoni* has been reported. Chapter I provides a brief review of natural products, alkaloids, alkaloid present in *P. microphyllus* specie mainly epiisopiloturine and epiisopilosine and schistosomiasis. Chapter II shows the *in vivo* effect of epiisopiloturine (EPI) against adult and youth worms of *S. mansoni*. In the experiment, mice (Balb/C) were treated post-infection 21 days with 40 and 300 mg/kg of EPI by oral route and 45 days post infection with single doses of 40, 100 and 300 mg/kg by oral route. The treatment with EPI 40 mg/kg was more effective in adult worms as compared with 100 and 300 mg/kg. Treatment with 40 mg/kg significantly reduced total worm burden (adults), leading to reduction in hepatosplenomegaly, reduced the burden of eggs in the feces and decreased the diameter of granulomas. In addition, the *in vivo* treatment for young worms with 40 mg/kg showed a reduction of total 50.2% parasite load. Histopathological studies were performed in liver, spleen, lung, kidney and brain and EPI demonstrated to have an LD50 of 8000 mg/kg. Chapter III we evaluate *in vivo* effect of epiisopilosine (EPIIS) alkaloid against adult worms of *S. mansoni*. In addition, its cytotoxic effect, *in silico* toxicity and acute toxicology was analyzed. In the anthelmintic tests, mice were treated with EPIIS at 60 days post-infection (adult worms) with a single dose of 100 and 400 mg/kg. The treatment reduced the total worm burden significantly even at the lowest concentration of 100 mg/kg, reduced the hepatosplenomegaly, and reduced immature eggs. In addition, the alkaloid showed to be well tolerable in *in silico* analyzes and had no cytotoxic effects on HaCaT and NIH-3T3 cells with 512 µg/mL. The acute toxicity evaluation of EPIIS showed no toxic effect at the 2000 mg/kg dose and the treatments showed no significant difference in hematological and biochemical parameters in relation to control group. In conclusion, the tested alkaloids show potential for use in the treatment of schistosomiasis, without demonstrating apparent cytotoxicity and acute toxicity.

**Keywords:** Natural Products, jaborandi, *Schistosoma mansoni*, schistosomules, toxicity.

## LISTA DE ABREVIACÕES

4TI	Células de adenocarcinoma de mama murinho
AFA	Ácido Acético-Formaldeído-Álcool
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
B16F10	Células de melanoma de camundongos
CEUA	Comissão de Ética para a uso de animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL50	Dose letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DSC	Calorimetria de varrimento diferencial
EPI	Epiisopiloturina
EPIIS	Epiisopilosina
FBS	Soro Fetal Bovino
HaCaT	Células de queratinócito humano
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LDL	Lipoproteina de Baixa Densidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NIH-3T3	Células de fibroblasto murinho
OECD	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde

PZQ	Praziquantel
RTCA	Análise de células em tempo real
TGA	Análise Gravimétrica Térmica
VCM	Volume Corpuscular Médio
WHO	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Estrutura química da morfina, um alcaloide verdadeiro. .... 23
- FIGURA 2:** Distribuição geográfica da espécie *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). .... 24
- FIGURA 3:** Pilocarpina e sua respectiva estrutura química, obtida a partir das folhas de *Pilocarpus microphyllus*. .... 25
- FIGURA 4:** Estruturas químicas representativas dos alcaloides Epiisopiloturina (EPI) e epiisopilosina (EPIIS). Os seus heteroátomos e estereoisómeros estão anotados. .... 28
- FIGURA 5:** Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. .... 29
- FIGURA 6:** Estrutura química do praziquantel. .... 31
- FIGURA 7:** Esquema representativo do ciclo de *S. mansoni* mantido em laboratório. .... 46
- FIGURA 8:** Formas neutras e iônicas de EPI. 1- Forma neutra; 2- Forma catiônica; 3- forma aniônica (A). Determinação potenciométrica do pKa (B). Ilustração dos valores preditos de pKa da EPI usando o método ChemAxon. (C). DSC (D) e DSC-TGA (E) dados que ilustram a degradação térmica que ocorre em torno de 220°C, em uma única etapa. .... 51
- FIGURA 9:** Microscopia eletrônica de varredura da região dorsal do meio do corpo de vermes machos de *S. mansoni* recuperados 45 dias após a infecção, coletados por perfusão do sistema porta-hepático. A e B: vermes não tratados (controle). C e D: vermes de camundongos tratados com 40 mg/kg de PZQ. E e F: vermes de camundongos tratados com 40 mg/kg de EPI. As barras de escala em A, C e E mostram 5 µm, e em B, D e F mostram 10 µm. .... 56
- FIGURA 10:** Fotomicrografias de granulomas hepáticos de camundongos 45 dias após a infecção. .... 58
- FIGURA 11:** Estudo histopatológico das seções dos órgãos de diferentes grupos de camundongos. Comparação entre a histologia do: fígado (A, B, C), baço (D, E, F), pulmão (G, H, I), rim (J, K, G), e cérebro (M, N, O) obtido a partir de camundongos swiss (n = 4) tratados com 0,0 (primeira coluna), 530 (segunda coluna) ou 8000 (terceira coluna) mg/kg de EPI. .... 61
- FIGURA 12:** Estrutura química do alcaloide EPIIS, com heteroátomos e estereoisómeros anotados. .... 80

<b>FIGURA 13:</b> Espectro de massa de EPIIS. (A) Íon pseudomolecular com m/z 286,9 Da [M + H] <sup>+</sup> . (B) fragmentos MS <sup>2</sup> com m/z 268,8 Da [M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup> e 180,7 Da.....	85
<b>FIGURA 14:</b> Efeito na carga parasitária com administração de 100 mg/kg e 400 mg/kg de EPIIS em dose única, por via oral. ....	86
<b>FIGURA 15:</b> Efeito na carga total de ovos com uma dose única de 100 mg/kg de EPIIS administrado a camundongos estavam infectados com <i>S. mansoni</i> .. ....	88
<b>FIGURA 16:</b> Efeito do tratamento com EPIIS sobre o peso relativo do fígado e do baço....	89
<b>FIGURA 17:</b> Microscopia eletrônica de varredura de adultos de <i>S. mansoni</i> recuperados 48 h depois do tratamento com EPIIS (100 mg/kg). A-D: grupo controle - não tratado (A e C são vermes machos, B e D são vermes fêmeas); E-L: verme macho e fêmea tratados com 100 mg/kg de EPIIS. E, I, J e L são vermes machos; F, G, H e K são vermes fêmeas.. ....	90
<b>FIGURA 18:</b> Índices de adesão de NIH-3T3 e células de HaCaT.....	92
<b>FIGURA 20:</b> Fotomicrografias de fígado (A1, A2), baço (B1, B2), rim (C1, C2), pulmão (D1, D2) e cérebro (E1, E2), obtidos de animais dos grupos controle não tratado (primeira coluna) e tratados com 2000 mg/kg de EPIIS (segunda coluna).. ....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos da EPI contra <i>S. mansoni</i> jovens (tratados 21 dias após a infecção).....	52
<b>Tabela 2.</b> Efeitos da EPI contra <i>S. mansoni</i> adultos (45 dias após a infecção). .....	53
<b>Tabela 3.</b> Efeito do tratamento com EPI na oviposição dos adultos, 15 dias pós-tratamento (45 dias após a infecção).....	54
<b>Tabela 4.</b> Efeito do tratamento com EPI no peso relativo dos órgãos.....	55
<b>Tabela 5.</b> Diâmetro do granuloma ( $\mu\text{M}$ ) no fígado dos camundongos dos grupos infectados tratados e não tratados 45 dias após a infecção (vermes adultos). .....	59
<b>Tabela 6.</b> Efeito na oviposição, 15 dias após o tratamento com EPIIS (60 dias após a infecção). .....	88
<b>Tabela 7.</b> Análise <i>in silico</i> das propriedades toxicológicas de EPIIS usando a metodologia pkCSM.....	91
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos Swiss fêmeas tratados com EPIIS por via oral. ....	93
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros hematológicos obtidos do soro de camundongos Swiss fêmeas tratados com EPIIS por via oral. ....	94

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1	PRODUTOS NATURAIS .....	20
3.2	ALCALOIDES .....	21
3.3	ALCALOIDES DE <i>P. MICROPHYLLUS</i> .....	23
3.4	EPIISOPILOTURINA E EPIISOPILOSINA .....	26
3.5	ESQUISTOSSOMOSE .....	28
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II – ATIVIDADE DA EPIISOPILOTURINA <i>IN VIVO</i> CONTRA <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i></b> .....	<b>42</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	43
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.2.1	<i>Purificação e Caracterização de EPI</i> .....	44
4.2.2	<i>Determinação do <math>pK_a</math> potenciométrico</i> .....	45
4.2.3	<i>Parasitas, Hospedeiros Intermediário e Definitivo</i> .....	46
4.2.4	<i>Tratamento in vivo com EPI</i> .....	47
4.2.4.1	<i>Tratamento de camundongos infectados com vermes adultos.</i> .....	47
4.2.4.2	<i>Tratamento de camundongos infectados com vermes jovens.</i> .....	47
4.2.5	<i>Estimativa da carga parasitária e dos ovos</i> .....	48
4.2.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	48
4.2.7	<i>Histopatologia hepática e medição de granuloma</i> .....	48
4.2.8	<i>Estudos de toxicidade aguda e histopatológicos</i> .....	49
4.2.9	<i>Análises estatísticas</i> .....	49
4.3	RESULTADOS .....	50
4.3.1	<i>Caracterização da EPI</i> .....	50
4.3.2	<i>Efeito da EPI em <i>S. mansoni</i> jovens</i> .....	52
4.3.3	<i>Efeito da EPI em <i>S. mansoni</i> adulto</i> .....	52
4.3.4	<i>Efeito da EPI na eliminação de ovos e no peso do fígado e baço</i> .....	53
4.3.5	<i>Efeito da EPI sobre as alterações tegumentares</i> .....	55
4.3.6	<i>Histopatologia hepática e medição granuloma</i> .....	57
4.3.7	<i>Estudos de toxicidade aguda e histopatológicos</i> .....	59
4.4	DISCUSSÃO .....	62
4.5	CONCLUSÕES .....	68
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III – ATIVIDADE DA EPIISOPILOSINA <i>IN VIVO</i> CONTRA <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i></b> .....	<b>77</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	79
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	80
5.2.1	<i>Purificação do alcaloide</i> .....	80
5.2.2	<i>Parasitas e hospedeiros intermediários e definitivos</i> .....	81
5.2.3	<i>Tratamento in vivo contra vermes <i>S. mansoni</i> adultos</i> .....	81
5.2.4	<i>Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	81
5.2.5	<i>Análises in silico e propriedades toxicológicas</i> .....	82
5.2.6	<i>Cultura de células e ensaios de citotoxicidade in vivo</i> .....	82
5.2.7	<i>Avaliação da Toxicidade Aguda</i> .....	83



5.2.8	<i>Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos</i>	83
5.2.9	<i>Análise histopatológica</i>	84
5.2.10	<i>Análise estatística</i>	84
5.2.11	<i>Protocolo ético</i>	84
5.3	<b>RESULTADOS</b>	84
5.3.1	<i>Purificação da EPIIS</i>	84
5.3.2	<i>EPIIS mostrou atividade contra formas adultas de <i>S. mansoni</i> em camundongos infectados</i>	85
5.3.3	<i>EPIIS diminui o desenvolvimento dos ovos, bem como os pesos do fígado e do baço</i>	87
5.3.4	<i>EPIIS causou mudanças na morfologia do tegumento de <i>S. mansoni</i></i>	89
5.3.5	<i>EPIIS têm previsão in silico de baixa toxicidade</i>	90
5.3.6	<i>Efeito da EPIIS na viabilidade celular</i>	91
5.3.7	<i>EPIIS não mostrou sinais clínicos visíveis de toxicidade aguda em camundongos</i>	92
5.3.8	<i>EPIIS não causou alterações bioquímicas ou hematológicas em camundongos</i>	93
5.3.9	<i>EPIIS não causou alterações histopatológicas</i>	94
5.4	<b>DISCUSSÃO</b>	96
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b>	<b>108</b>
7.1	ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS RELACIONADOS AO REFERIDO PROJETO	108
7.2	ARTIGOS PUBLICADOS EM PARCERIAS	108
7.3	TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS	109
	<b>APÊNDICE A</b>	<b>110</b>
	<b>APÊNDICE B</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE C</b>	<b>114</b>
	<b>APÊNDICE D</b>	<b>116</b>
	<b>APÊNDICE E</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE F</b>	<b>120</b>
	<b>APÊNDICE G</b>	<b>122</b>

## 1 Introdução

Os produtos naturais têm recebido uma atenção considerável por conta da sua variedade de princípios ativos e suas propriedades terapêuticas (NEWMAN E CRAGG, 2012; MORAES et al., 2012). O uso de plantas, como fonte de novos fármacos mostra um grande potencial para utilização em várias doenças e podem ser de grande importância para a indústria farmacêutica. Por exemplo, uma análise da origem das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 mostrou que produtos naturais ou drogas derivadas de produtos naturais compreendiam 28% de todas as novas substâncias químicas lançadas no mercado. Além disso, 24% destes eram compostos miméticos sintéticos ou naturais, com base no estudo de farmacóforos relacionados à produtos naturais (NEWMAN et al., 2003; CHIN et al., 2006; CRAGG E NEWMAN, 2013; MORAES, 2015).

A família Rutaceae contém cerca de 161 gêneros e 2070 espécies, sendo que muitas destas tem importância econômica, devido ao seu valor medicinal (STEVENS, 2016; ROCHA et al., 2017). O gênero *Pilocarpus* pertence a essa família e contém espécies medicinais que são originárias do Brasil e países vizinhos (LIMA et al., 2017). A espécie *Pilocarpus microphyllus*, pertencente a este gênero, é conhecida mundialmente devido a presença do alcaloide pilocarpina nas suas folhas (PINHEIRO, 1997; LIMA et al., 2017). Este alcaloide é produzido no Brasil em escala industrial e exportado para a indústria farmacêutica internacional (BRANDÃO, 2008) devido a sua utilização para o tratamento do glaucoma e xerostomia (AGBAN et al., 2016; GIL-MONTOYA et al., 2016).

Vários outros alcaloides já foram identificados a partir do gênero *Pilocarpus*, como a epiisopiloturina e a epiisopilosina. Estes dois alcaloides foram obtidos a partir do resíduo industrial gerado durante a produção de pilocarpina, e vêm se mostrando promissores quanto a sua atividade esquistossomocida, pois apresentaram atividade *in vitro* contra *S. mansoni* (ROCHA, 2013; VERAS et al., 2012; GUIMARAES, 2014).

A epiisopiloturina e epiisopilosina são alcaloides imidazóis que foram isolados das folhas de *P. microphyllus*, caracterizados quimicamente e mostraram ter atividade contra *S. mansoni* adulto sem apresentar citotoxicidade para células de mamíferos. Esses resultados geraram uma patente com o governo brasileiro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). A atividade anti-inflamatória do alcaloide epiisopiloturina também já foi relatada usando vários agentes que induziram edema de pata e peritonite

em camundongos, e esta ação pode ajudar a potencializar o efeito da epiisopiloturina no tratamento da reação inflamatória causada pelos ovos do *S. mansoni*. (LEITE et al., 2011; SILVA et al., 2013; VERAS et al., 2013; VERAS et al., 2012).

O limiar entre a academia e a iniciativa privada é fundamental para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Neste projeto, uma das empresas parceiras é a Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação Ltda., empresa pertencente ao grupo Centroflora. A Phytobios conta com um laboratório de Inovação em Produtos Naturais (LIPRON) voltado para a obtenção de extratos/ativos de alto valor para Pesquisa & Desenvolvimento, assim como bioprospecção a partir da biodiversidade para as mais diversas finalidades ligadas a tecnologias naturais e biotecnologia. A Phytobios tem interesse em trazer o processo de isolamento e produção dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina para uma maior escala e torna-lo um produto de alto valor agregado para a indústria farmacêutica.

Visto que os alcaloides já demonstraram potencial atividade *in vitro* contra *S. mansoni*, neste trabalho pretende-se aprofundar os estudos desta atividade biológica, realizando testes *in vivo* e testes toxicológicos para servir como prova de conceito às empresas da área farmacêutica, a fim de desenvolver um produto a partir da reutilização dos resíduos da indústria de pilocarpina, com alto valor econômico.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Obtenção de novos farmoquímicos a partir de *P. microphyllus* para uso no controle da esquistossomose.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina contra *S. mansoni*;
- Realizar estudos de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina;
- Realizar estudos toxicológicos e estudos histopatológicos da dose letal média (DL50) dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina;
- Utilizar os farmoquímicos para desenvolvimento de bioprodutos para a indústria farmacêutica;



# Capítulo I

Revisão de Literatura

## 3 Capítulo I – Revisão de literatura

### 3.1 Produtos Naturais

Desde tempos imemoriais o homem utiliza as plantas com fins terapêuticos. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. Estes trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, para o conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/insetos-planta (VIEGAS et al., 2004).

Sistemas à base de plantas continuam desempenhando um papel crucial na área da saúde, e a sua utilização por diferentes culturas já foi amplamente documentada (MOERMAN, 1986; JOHNSON, 1999; CRAGG e NEWMAN, 2013). Desde 1985, já existem relatos da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o uso de plantas medicinais, sendo estimado que em 1985, aproximadamente 65% da população do mundo predominantemente utilizavam medicamentos tradicionais derivados de plantas para os seus cuidados de saúde primários (FARNSWORTH et al., 1985). A importância dos produtos naturais na medicina moderna já foi descrita em uma série de avaliações anteriores (MORAES, 2012; KAYSER et al., 2003; NEWMAN e CARGG, 2009; BRAHMACHARI, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2012), por exemplo, uma análise da origem dos medicamentos desenvolvidos entre 1981 e 2002 mostrou que os produtos naturais ou drogas derivadas de produtos naturais compõem 28% de todos os novos produtos químicos lançados no mercado. Além disso, 24% destes eram sintéticos ou mimetizavam compostos naturais, com base no estudo dos farmacóforos relacionadas com produtos naturais (NEWMAN et al., 2003; CHIN et al., 2006; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Embora existam, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que possamos descobrir e sintetizar novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada (BARREIRO e BOLZANI, 2009). São inúmeros os compostos extraídos de plantas empregados na

preparação de agentes medicamentosos que já se encontram disponíveis no mercado farmacêutico (BRESOLIN e CECHINEL, 2003).

As substâncias químicas caracterizadas como princípio ativo são, em sua maioria, oriundas do metabolismo secundário das plantas, tendo sua função relacionada com a atuação desta com o meio ambiente que a envolve (MAIA, 2008). A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados da via do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicérides (LEITE, 2008).

A maior parte desta diversidade estrutural dos metabólitos secundários é gerada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura, modificações estas que podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação a sua estrutura inicial (KLIEBESTEIN, 2004). De acordo com a rota biossintética, os metabólitos secundários são classificados em três grandes famílias: substâncias fenólicas, terpenos/esteróides e alcaloides (BOURGARD, et al., 2001).

### **3.2 Alcaloides**

Os alcaloides representam cerca de 20% das substâncias naturais descritas, sendo um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural (HENRIQUES et al, 2001). Desta forma, dos cerca de 150.000 compostos isolados de plantas e animais terrestres, aproximadamente, 14% são alcaloides. Inicialmente, as plantas superiores eram as principais fontes para o isolamento deste metabólito, principalmente aqueles utilizados como medicamentos ou conhecidos pela sua alta toxicidade. Entretanto, novas fontes para a obtenção foram investigadas no final do século XX, incluindo anfíbios, artrópodes, mamíferos, esponjas, peixes, fungos e bactérias, e *Homo sapiens* (GRANATO et. al, 2008; MARASCHIN, VERPOORTE, 1999). De acordo com estudos feitos por Cordell et al. (2001), em cerca de 35 famílias de plantas superiores foram detectados alcaloides, no entanto, estes ainda não foram isolados. Contudo, já foram identificados, pelo menos, 22000 alcaloides oriundos somente de plantas superiores, mas

este número excederia 30000 alcaloides considerando todas as fontes; apesar de que muitas famílias de plantas ainda não foram estudadas para este grupo de moléculas (CORDELL et al., 2001).

Nos vegetais, os alcaloides distribuem-se por toda a planta (folhas, sementes, raízes e caules), acumulando-se nos tecidos vivos de crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos dentro dos vacúolos. Quando na forma de sais, encontram-se nas paredes celulares. São empregados na medicina, geralmente, em estado puro, sendo seu uso indicado somente de forma adequada e regulada (COSTA, CUNHA, 2000; COSTA, 2008).

Quanto ao papel dos alcaloides para as plantas, ainda não está totalmente elucidado, parecendo estar relacionado a sua toxicidade, à medida que representa um mecanismo químico de defesa por conta da grande variedade de efeitos fisiológicos que exercem sobre animais e microorganismos. Vários alcaloides são tóxicos aos insetos e atuam como repelente para herbívoros. Acredita-se que atuem também como reserva de nitrogênio, reguladores do crescimento, do metabolismo interno e da reprodução, como agentes de desintoxicação e transformação simples de outras substâncias nocivas ao vegetal, além de proteção contra raios UV (GUERRA, NODARI, 2001; TAIZ e ZEIGER, 2002; MANSKE e HOLMES, 1950; LEVINSON, 1976)

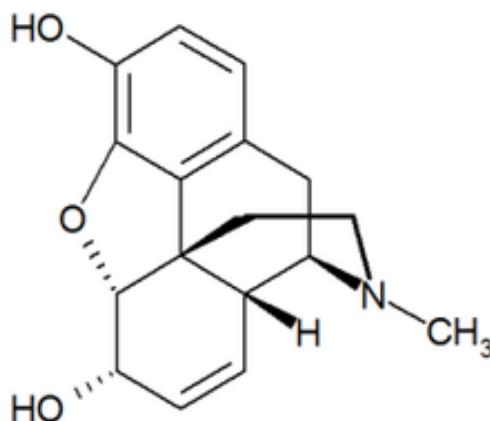
Em virtude da grande variedade de propriedades físico-químicas, estruturais e farmacológicas, a definição precisa para este grupo torna-se difícil. Foram inúmeras as definições propostas por pesquisadores que acreditavam que os verdadeiros alcaloides eram compostos por um ou mais átomos de nitrogênio pertencendo ao anel heterocíclico, mantendo sua característica básica. Essa definição, no entanto, não é adequada, pois exclui compostos nitrogenados como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso (HESSE, 1978). Outros por sua vez, acreditavam que os alcaloides eram substâncias de estrutura molecular complexa encontradas em plantas e características de determinadas espécies vegetais, o que também é um conceito incompleto por não considerar que essas substâncias também são encontradas em outros seres vivos (IKAN, 1991). Foi então que, Pelletier estabeleceu a seguinte definição: “Um alcaloide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo nitrogênio num estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos”. Tal definição exclui compostos nitrogenados como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso. Outras definições foram



apresentadas, posteriormente, por outros cientistas, contudo até o momento nenhuma se apresentou completamente abrangente (IKAN, 1991; BRUNETON, 1993; WATERMAN, 1998).

Devido à grande diversidade estrutural desta classe, algumas subclasses foram criadas para abrigar as várias estruturas que estas moléculas podem apresentar. Uma dessas subclasses é determinada quanto à estrutura química dos alcaloides e é provavelmente o modo mais amplamente aceito de classificação desse grupo. O critério principal é a presença do anel heterocíclico, assim, os alcaloides são classificados em alcaloides verdadeiros, que são aqueles derivados de aminoácidos que possuem anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio (figura 1); protoalcaloides, que também derivam de algum aminoácido, e possuem átomo de nitrogênio não pertencente a um anel heterocíclico, e por fim, pseudoalcaloides, que não derivam de um aminoácido, mas incorporam o nitrogênio de outras reações, como transaminação (ANISZEWSKI, 2007).

**FIGURA 1:** Estrutura química da morfina, um alcaloide verdadeiro.



### 3.3 Alcaloides de *P. microphyllus*

No Brasil a pesquisa de ativos naturais provenientes de espécies vegetais da biodiversidade, tem se expandido e contribuído com novas alternativas terapêuticas. Um exemplo deste desenvolvimento é a pesquisa com a espécie *P. microphyllus*, popularmente conhecida como jaborandi. Esta espécie é originária do Norte e Nordeste do Brasil de ocorrência no leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e ao norte do Piauí na divisa com o Maranhão (figura 2).

**FIGURA 2:** Distribuição geográfica da espécie *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). As imagens das folhas de Jaborandi foram obtidas da área de plantação do grupo Centroflora no Piauí, em acordo com o termo de consentimento da empresa.

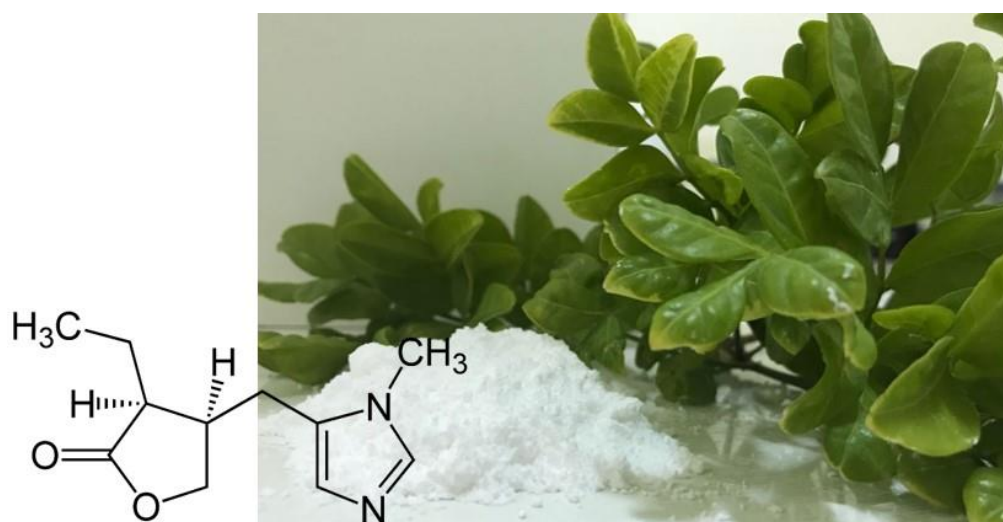


O nome jaborandi é sinônimo vulgar de várias plantas silvestres do Brasil e países vizinhos, das famílias Piperaceae e Rutaceae, que possuem propriedades medicinais (CORRÊA, 1969). A família Rutaceae possui cerca de 161 gêneros e 2070 espécies (STEVENS, 2016; ROCHA et al., 2017). No Brasil encontram-se 13 espécies, sendo que 11 delas ocorrem exclusivamente no território brasileiro, com maior ocorrência em sua porção oriental, constituindo o centro de diversidade genética do gênero (SKORUPA, 1996). Trata-se de uma espécie nativa de regiões de clima quente e úmido, de porte arbustivo verdejante e bastante ramificado. Possui um bom crescimento vegetativo em chapadões arenosos, podendo também ser encontrado em terrenos argilosos de baixa fertilidade e cobertos por vegetação de capoeira, como em solos litólicos com afloramentos rochosos (MARQUES & COSTA, 1994), florestas ombrófilas densas, mas

também onde as matas são menos densas, sendo frequentemente encontrada em afloramentos rochosos, regionalmente denominados canga, que são reservas minerais cobertas com vegetação savânica. No centro da mata é encontrado preferencialmente em ambientes mais iluminados, como em clareiras (VEGEFLORA, 2010). Os representantes da família apresentam hábito muito variado, desde árvores, arbustos até ervas, sendo rara esta última condição (CRONQUIST, 1981).

O *P. microphyllus* é uma das espécies medicinais brasileiras de maior destaque constando em farmacopéias de todo o mundo, devido ao uso de seu princípio ativo pilocarpina (LEWIS & ELVIN-LEWIS, 1977), sendo ainda na atualidade de grande relevância para as indústrias farmacêuticas e farmoquímicas nacionais e internacionais. Das folhas desta espécie são processados os sais de pilocarpina, tais como o cloridrato de pilocarpina, nitrato de pilocarpina, além de sua forma livre (pilocarpina base) utilizados na formulação de colírios para tratamento do glaucoma (figura 3) (TSAI et al., 2003; NORDSTROM et al., 2005; LIMA, 2008), sendo esta patologia de ampla ocorrência mundial e responsável pela exportação deste ativo para Europa, Estados Unidos, Japão, China e Índia.

**FIGURA 3:** Pilocarpina e sua respectiva estrutura química, obtida a partir das folhas de *Pilocarpus microphyllus*.



Outras aplicações farmacológicas da pilocarpina foram elucidadas posteriormente, como por exemplo, para o tratamento da xerostomia (BAPTISTA NETO, 2004) na forma oral (formulação em comprimido). Essa patologia pode ou não estar associada a várias doenças e/ou alterações sistêmicas, entre elas a Síndrome de Sjögren (BIVONA, 1998);

alterações hipofisárias, hipotireoidismo (WARDROP et al., 1998), diabetes (ZACHARIASEN, 1996; FIELD et al., 1997) e por indução através de radiação ionizante, para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço via radioterapia. Esta última indicação foi aprovada pelo FDA (“Food and Drug Administration”) em 1994 (MOURA, 2003). A xerostomia costuma ainda aumentar a morbidade dos pacientes com câncer avançado (DAVIES, 1997).

Assim como outras espécies vegetais, as folhas de jaborandi também contêm outros ativos e alcaloides imidazólicos, cujas propriedades farmacológicas e fisiológicas não foram totalmente elucidadas. E por meio da parceria da Anidro do Brasil Extrações S.A. – Unidade Piauí com a Universidade Federal do Piauí (UFPI), através do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec) no Campus de Parnaíba, desde 2009 com atividades de pesquisa, extensão e prospecção tecnológica, resultou no desenvolvimento de trabalhos voltados a obtenção de moléculas bioativas (alcaloides imidazólicos) oriundos do jaborandi para uso em doenças negligenciadas (MIURA, 2009), que produziu a autoria de patente (PI0904110-9) e artigo científico descrevendo a atividade esquistossomicida do alcaloide epiisopiloturina contra formas jovens e adultos *in vitro* do parasita *S. mansoni*, além de inibir a oviposição do mesmo (VERAS et al., 2012). Como objetivo da parceria está a descoberta de novas propriedades terapêuticas de outros alcaloides presentes no jaborandi e aplicar como fonte de matéria-prima o refugo industrial da extração da pilocarpina, colaborando para melhor aproveitamento e redução do resíduo industrial.

O presente projeto tem grande relevância para região agregando maior valor a espécie jaborandi, possibilitando a exploração sustentável da mesma, bem como determinar a aplicabilidade dos alcaloides imidazólicos da espécie na área da saúde.

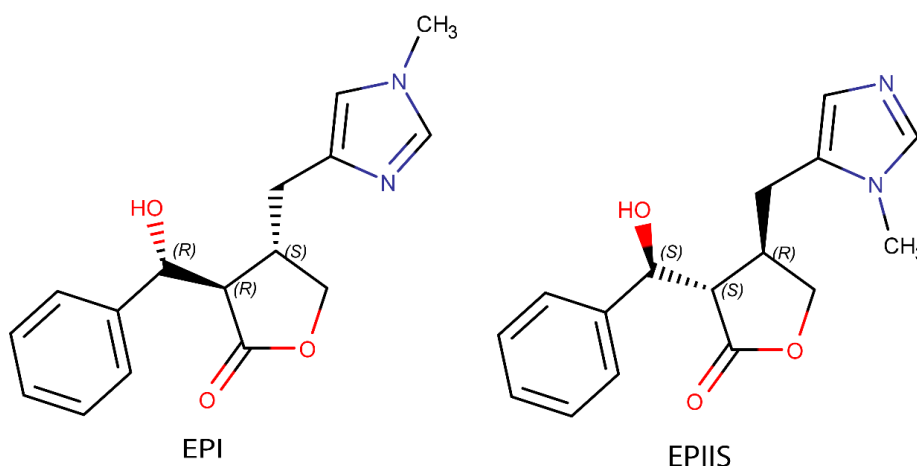
### **3.4 Epiisopiloturina e Epiisopilosina**

Vários alcaloides já foram identificados a partir do gênero *Pilocarpus*, como a epiisopiloturina e a epiisopilosina. Estes dois alcaloides vêm se mostrando promissores quanto a sua atividade esquistossomicida, pois apresentaram atividade *in vitro* contra *S.mansoni* (VERAS et al., 2012; GUIMARAES, 2014; ROCHA et al., 2017).

A epiisopiloturina (3S, 4R) -3 - [(R) -hidroxi (fenil) metil] -4 - [(3-metil-3H-1λ-imidazolidin-5-il) metil] oxolan-2-ona (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) é um alcaloide que apresenta um grupo hidrobenzílico e um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C (Figura 4). Uma característica interessante desta molécula é o alinhamento paralelo do anel do benzeno e do metil imidazol separado por um espaçamento interplanar de 3,758 Å, indicando uma interação da ligação π-π. Outra característica do empacotamento cristalino é a presença de uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo hidroxila, de uma molécula, e o N1 do anel imidazol metil de outro, formando assim uma cadeia contínua de moléculas ligadas ao hidrogênio (VERAS et al., 2013). Este alcaloide foi isolado das folhas de *P. microphyllus*, caracterizado quimicamente e mostrou ter atividade contra *S. mansoni* adulto sem apresentar citotoxicidade para células de mamíferos. A atividade anti-inflamatória deste alcaloide também já foi relatada e esta ação pode ajudar a potencializar o efeito da epiisopiloturina no tratamento da reação inflamatória causada pelos ovos do *S. mansoni*. (LEITE et al., 2011; SILVA et al., 2013; VERAS et al., 2013; VERAS et al., 2012; GUIMARAES et al. 2014). Além disso, a epiisopiloturina já demonstrou atividade *in vitro* contra as cepas de *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/PH-8 na forma amastigota (MIURA, 2009).

A epiisopilosina (3R, 4S) -3 - [(S) -hidroxi (fenil) metil] -4 - [(3-metil-3H-1λ2-imidazolidin-4-il) metil] oxolan-2-ona contém 39 átomos (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) em sua estrutura molecular e apresenta 111 vibrações moleculares. É um isômero da epiisopiloturina (Figura 4) e demonstrou ser um estimulante periférico do sistema nervoso parassimpático (LUCIO et al., 2000) e tendo ainda propriedades físicas com Espectroscopia Raman identificadas junto ao alcaloide pilosina (BENTO et al., 2010). Esses alcaloides apresentam forma estrutural semelhante e ainda existem poucos trabalhos demonstrando suas atividades biológicas.

**FIGURA 4:** Estruturas químicas representativas dos alcaloides Epiisopiloturina (EPI) e epiisopilosina (EPIIS). Os seus heteroátomos e estereoisômeros estão anotados.



A atividade do alcaloide epiisopilosina *in vitro* foi determinada contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania chagasi* (ALBUQUERQUE et al., 2010). Além disso, apresentou atividade *in vitro* contra *S. mansoni* na concentração de 6,25 µg/mL e uma baixa atividade antibacteriana com uma concentração inibitória mínima – CIM de 800 µg/mL sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (ROCHA, 2017).

Todos estes resultados abrem portas para uma perspectiva de ensaios *in vivo* dos dois alcaloides, principalmente quanto a seu possível uso no tratamento da esquistossomose mansônica.

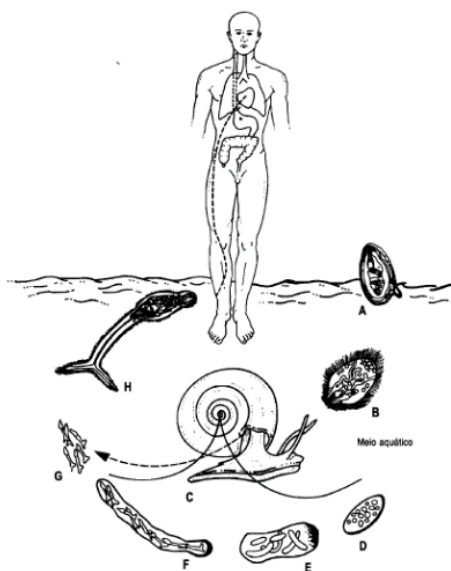
### 3.5 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. É considerada um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia e América do Sul e é a segunda mais importante doença parasitária humana depois da malária, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas e cerca de 800 milhões de pessoas vivendo em risco de infecção (STEINMAN et al., 2006). No ano de 2010 mais de 237 milhões de pessoas precisaram de tratamento e em 2011 esse número aumentou para mais de 243 milhões (WHO, 2013). A transmissão da esquistossomose já foi reportada em 78 países e seu peso global é estimado em 2,6 milhões DALYs, que significa os anos perdidos de vida saudável independentemente de

serem por morte prematura ou por incapacidade, ou seja, os anos de vida perdidos mais os anos de vida vividos com a deficiência (GDB 2015 DALYs e HALE, 2016; LAGO et al., 2017). Cinco espécies de *Schistosoma* parasitam os seres humanos, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*; as primeiras três espécies têm a mais ampla distribuição geográfica, mas *S. mansoni* é o principal agente etiológico da esquistossomose em humanos (esquistossomose mansônica) e é o modelo mais amplamente utilizado para estudos quimioterápicos (VAN DER WERF et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2012; WHO, 2013).

O ciclo de vida do *Schistosoma* é complexo (figura 5), envolvendo uma fase de reprodução sexuada em seres humanos (hospedeiro definitivo) e uma fase assexuada em um caramujo de água doce específico (hospedeiro intermediário). A infecção ocorre quando os humanos entram em contato com água que contém formas larvares do parasita nadando livremente (cercária). A cercária penetra na pele humana intacta e transforma-se em esquistossômulos (forma jovem), que residem na pele por até 72 horas antes de entrar em um vaso sanguíneo. Os esquistossômulos viajam através da corrente sanguínea por vários dias antes de se diferenciarem em vermes macho e fêmeas e acasalar (GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2012).

**FIGURA 5:** Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* A) ovo com miracídio; B) miracídio nadando para um caramujo (*Biomphalaria* sp.); C) penetração do miracídio no caramujo; D e E) esporocisto; F) esporocisto com cercarias dentro; G) cercarias saindo do caramujo; H) cercarias nadando para hospedeiro (Fonte: Neves 2010).



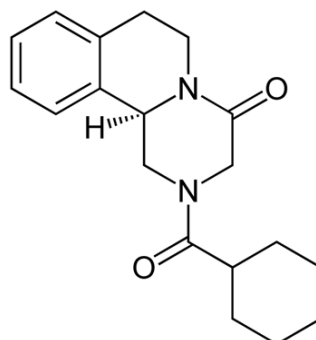
A doença está bem conhecida por sua cronicidade e debilitante morbidade (COLLEY et al., 2012; BARSOUMA et al., 2013). A patologia é causada principalmente pela deposição de ovos nos tecidos do hospedeiro definitivo. Órgãos tipicamente afetados incluem o trato urinário, os intestinos e o fígado, dependendo das espécies de *Schistosoma*. Ovos ficam presos nos tecidos e provocam uma reação inflamatória imunogênica, reação granulomatosa e fibrótica que causam doença intestinal, hepatoesplênica ou urinária, podendo desenvolver-se ao longo de muitos anos (GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2012).

A esquistossomose causa morbidades sistêmicas incluindo anemia, desnutrição e prejudica o desenvolvimento da infância, como resultado do efeito da inflamação continuada sobre o crescimento normal, metabolismo do ferro, e capacidades cognitiva e fisiológica. Além disso, a esquistossomose ectópica pode levar a morbidades inesperadas (por exemplo, migração de parasita ou ovos para o sistema nervoso central, e ovos nos órgãos reprodutores) (VAN DER WERF et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; GRAY et al., 2010; COLLEY et al., 2012; BARSOUMA et al., 2013). Esta enfermidade muitas vezes ocorre ao lado de outras doenças infecciosas, tais como a malária, a tuberculose e, especialmente AIDS (COLLEY et al., 2012; SECOR, 2012). A co-infecção de *Schistosoma* com bactérias, protozoários e helmintos aumenta a gravidade da doença em seres humanos, o que tem implicações para o tratamento e recuperação do paciente (ABRUZZI, 2011).

Desde os anos de 1980, o tratamento e controle da esquistossomose conta com um único fármaco, o praziquantel (PZQ) (figura 6), pois é seguro e eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* (CIOLI et al., 1995, CIOLI et al., 2014). Porém, este medicamento já vem sendo usado a cerca de 40 anos e evidências de resistência e de baixa eficácia do PZQ já foram relatados (FALLON E DOENHOFF, 1994; ISMAIL et al., 1996).



**FIGURA 6:** Estrutura química do praziquantel (Fonte: Novaes e Araújo, 1999).



O tratamento com o PZQ pode apresentar falhas devido a eficácia estágio específico peculiar da droga, pois este é ativo contra esquistossômulos nos dois primeiros dias após a sua penetração na pele, depois, neste momento e por um período de aproximadamente quatro semanas, os parasitas perdem a sua susceptibilidade e podem amadurecer para as formas adultas (DOENHOFF et al., 2008; HAGAN et al., 2004; SABAH et al., 1986). Assim, é necessário re-tratamento para eliminar esses parasitas que, desde então, amadureceram. Além disso, os comprimidos de PZQ são grandes, sabor amargo, e até à data, não existe formulação pediátrica prontamente disponível (CIOLI et al., 2014; COLLEY 2014).

O fato do PZQ ser o único medicamento utilizado para tratamento da doença já se tornou uma preocupação global, dessa forma, é nítido a necessidade de pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos e novas formas de tratamento. A busca de compostos anti-helmíntico, principalmente a partir de fontes naturais, tem sido intensificada nos últimos anos (MORAES 2012, MORAES 2015), toda esta busca está resumida em um trabalho publicado recentemente, que mostra os estudos realizados para o tratamento da esquistossomose a partir de meados de 1910 até o ano de 2016, onde foram reunidos mais de 100 compostos estudados com informação sobre ação terapêutica *in vitro* e/ou *in vivo*, toxicidade e perfis farmacocinéticos (LAGO et al., 2017). Todos estes esforços podem representar uma esperança no controle da esquistossomose e mostram a necessidade de busca de novos compostos para o tratamento da doença.

### Referências

- ABRUZZI, A.; FRIED, B. Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with bacteria, protozoa and helminths. *Adv. Parasitol.* 77, 1–85. 2011.
- AGBAN, Y.; LIAN, J.; PRABAKAR, S.; SEYFODDIN, A.; RUPENTHAL, I.D. Proteínas de colágeno reticuladas de nanopartículas para fornecimento sustentado de cloridrato de pilocarpina. **Int J Pharm.** 501 (1-2): 96-101. **2016.**
- ALBUQUERQUE, M.C. Atividade In vitro de Extratos e Frações de *Peschiera Affinis*, *Pithecellobium dulce* e *Pilocarpus Microphyllus* sobre *Leishmania Chagasi*. Fortaleza, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Coordenadoria de Pós-graduação, Universidade Estadual do Ceará.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloids: secrets of life. Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role. Oxford: **Elsevier**; 2007.
- BAPTISTA NETO, C.; SUGAYA, N.N. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. **Revista Biociência, Taubaté**, v.10; n.3, p.147-151, jul./set. 2004.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Fármacos. **Quím. Nova.** v. 32; n 3, p. 679-688, 2009.
- BARSOUMA, R.S.; ESMAT, G.; EL-BAZB, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J. Adv. Res.** v. 4; n 5, p. 433–444, 2013.
- BARSOUMA, R.S.; ESMAT, G.; EL-BAZB, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J. Adv. Res.** v. 4; n 5, p. 433–444, 2013.
- BENTO, R. R. F. et al. Comparative vibrational spectra of pilosine and epiisopilosine crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 40, n. 2, p. 217-223, jun. 2010.
- BIVONA, P.L. Xerostomia. A common problem among the elderly. **New York State Dental Journal**, USA, v. 64; n. 6, p. 46-52, 1998.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, p 839-51, 2001.

- BRAHMACHARI G. Natural products in drug discovery: impacts and opportunities – an assessment. In: *Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry*. Brahmachari G (Ed.), **World Scientific Publishing Company**, p. 1–199. 2011.
- BRANDÃO MG, ZANETTI NN, OLIVEIRA P, GRAEL CF, SANTOS AC, MONTE-MÓR RL. Plantas medicinais brasileiras descritas pelos naturalistas europeus do século XIX e na Farmacopeia Oficial. **J Ethnopharmacol** 120: 141-148. 2008.
- BRESOLIN, T.M.B; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: **UNIVALI**, 2003.
- BRUNETON, J. *Pharmacognosie-Phytochimie Plantes Médicinales*. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 1993.
- CHIN YW, BALUNAS MJ, CHAI HB *et al.* Drug discovery from natural sources. **AAPS J.** 8(2), E239–E253. 2006.
- CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B. *et al.* Drug discovery from natural sources. **AAPS J.** v. 8, n 2, p. E239–E253, 2006.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 195; n 1, p. 23–29, 2014.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 195; n 1, p. 23–29, 2014.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present... and future? **Pharmacol. Ther.** v, 68; n 1, p. 35–85, 1995.
- COLLEY, D.G. Morbidity control of schistosomiasis by mass drug administration: how can we do it best and what will it take to move on to elimination? **Trop. Med. Health** v. 42; Suppl. 2, p. 25–32, 2014.
- COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet** v. 383; n 9936, p. 2253–2264, 2012.
- COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet** v. 383; n 9936, p. 2253–2264, 2012.

CORDELL, G.A. Quinn-Beatie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytother Res.** v. 15, p. 183-205, 2001.

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

COSTA, A.F. CUNHA, A.P. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 2000.

COSTA, C.T.C. Atividade anti-helmíntica e imunomoduladora de extratos de *Cocos nucifera* L. Fortaleza-CE [dissertação]. Fortaleza (CE): Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2008.

CRAGG, G.M; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta.** 1830(6), 3670–3595. 2013.

CRONQUIST, A. Na integrated system of classification of flowering plants. New York, **Columbia University Press**, 1262p, 1981.

DAVIES, N.A. The management of xerostomia: a review. **European journal of cancer care**, England, v. 6, n. 3, p. 209-214, 1997.

DOENHOFF, M.; CIOLI, D. ; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 659–667, 2008.

FALLON, P.G.; DOENHOFF, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am J Trop Med Hyg.** v. 51, p. 83–88, 1994.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, R.O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy, **Bull. World Health Organ.** v. 63, p. 965–981, 1985.

FIELD, E.A.; LONGMAN, L.P.; BUCKNALL, R.; KAYE, S.B.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. The establishment of a xerostomia clinic: a prospective study. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 96-103, 1997.

GBD 2015 DALYs, HALE COLLABORATORS. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet** v. 388 (10053), p. 1603–1658, 2016.

GIL-MONTOYA, J.A.; SILVESTRE, F.J.; BARRIOS, R.; SILVESTRE-RANQIL, J. Tratamento da xerostomia e hipossalivação em idosos: uma revisão sistemática. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2016.

GRANATO, A.C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; SELEGHIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; MACEDO, M.L.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.O. Produtos naturais da Ascídia botrylloides giganteum, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 28; n 02, p. 192-198, 2008.

GRAY, D.J., MCMANUS, D.P.; LI, Y. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. **Lancet Infect. Dis.** v. 10; n 10, p. 733–736, 2010.

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

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Organizadores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 13-26, 2001.

GUIMARAES, M.A.; CAMPELO, Y.D.M.; VÉRAS, L.M.C.; LIMA, D.F.; CIANCAGLINI, P.; KUCKELHAUS, S.S., et al. Nanopharmaceutical Approach of Epiisopiloturine Alkaloid Carried in Liposome System: Preparation and *In Vitro* Schistosomicidal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. American Scientific Publishers. 14; 4519-4528; 2014.

HAGAN, P.; APPLETON, C.C.; COLES, G.C.; KUSEL, J.R.; TCHUEM-TCHUENTE, L.A. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends Parasitol.**, v.20, p. 92–97, 2004.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. organizadores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; p. 651-666, 2001.

HESSE, M. Alkaloid Chemistry. New York: **Wiley-Interscience**, 1978.

IKAN, R. *Natural Products: a Laboratory guide*. San Diego: Academic, 1991.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 214-218, 1996.

JOHNSON, T. CRC ethnobotany desk reference, **CRC Press**, Boca Raton, FL, 1999.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol. Res.** 90(Suppl. 2), S55–S62. 2003.

KLIEBENSTEIN, D.J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* transgenic lines. **Plant, Cell and Environment**. p 675- 84, 2004.

LAGO, E.M.; XAVIER, R.P.; TEIXEIRA, T.R.; SILVA, L.M.; FILHO, A.A.S.; MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Fut Med Chem**. Published online 13 december 2017.

LEITE, J. P. V. *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. 1ª Edição. Ed. **Atheneu**, São Paulo, p 344, 2008.

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 obtenção da epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias. PI 0904110-9 A2 **Revista de Propriedade Industrial, Instituto Nacional de Propriedade Industrial**, No 2108, p.132, 2011.

LEVINSON, H.Z. The defensive role of alkaloids in insects and plants. **Experientia** 32, 408-411, 1976.

LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P.F. *Medical botany - plants affecting man's health*. New York: John Wiley & Sons. 515p, 1977.

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.

LIMA, D.F.; DE LIMA, L.I.; ROCHA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; GRAZINA, L.G.; VILLA, C. et al. Variação sazonal nos principais alcalóides de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), uma espécie economicamente importante da flora brasileira. **PLoS ONE** 12 (2): e0170281. 2017.

LUCIO, E. M. R. A., Rosalen P.L., Sharapin, N., Souza Brito, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 23-35, 2000.

MAIA, C.N. Análise Fitoquímica e Atividade Antibacteriana “in vitro” de Extrato de Planta do Cerrado. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros/MG, 2008.

MANSKE, R.H.F.; HOLMES, H.L. *The Alkaloids: chemistry and physiology*. New York: Academic Press, 1950.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. v. 02; n 10, p. 24-28, 1999.

MARQUES, M.E.T.; COSTA, J.P.C. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPACPATU, 4 p. (Recomendações Básicas, 27), 1994.

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, antiesquistossomica e silagoga. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Piauí – UFPI, 2009.

MOERMAN, D.E. Medicinal plants of native America, **University of Michigan Museum of Anthropology**, Ann Arbor, MI, 1986.

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: *Current Topics In Tropical Medicine*. Rodriguez-Morales AJ (Ed.), InTech, **Rijeka**, H.R. Croatia, p. 333–358. 2012.

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: *Current Topics In Tropical Medicine*. Rodriguez-Morales AJ (Ed.), InTech, **Rijeka**, H.R. Croatia, p. 333–358. 2012.

MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Med. Chem.** 7(6), 801–820. 2015.

MOURA, E.F. Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de

Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural product scaffolds as leads to drugs. **Future Med. Chem.** v. 1; n 8, p. 1415–1427, 2009.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75; n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75; n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M.; SNADER K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.** v. 66; n 7, p. 1022–1037, 2003.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M.; SNADER K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.** v. 66; n 7, p. 1022–1037, 2003.

NORDSTROM, B.L.; FRIEDMAN, D.S.; MOZAFFARI, E.; QUIGLEY, H.A.; WALKER, A.M. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140; n. 4, p. 598-606. 2005.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do antihelmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Quim. Nova**, v. 22, n. 1, p.5-10, 1999.

PINHEIRO CUB. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): uma espécie selvagem e sua rápida transformação em uma cultura. *Econ Bot.* 51: 49-58, 1997.

REY, Luis. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 424p.

ROCHA, J.A.; ANDRADE, I.M.; VÉRAS, L.M.C.; QUELEMES, P.V.; LIMA, D.F.; SOARES, M.J.S.PINTO, P.L.S.; MAYO, S.J. IVANOVA, G.; RANGEL., M. CORREIA, M.; MAFUD, A.C.; MASCARENHAS, Y.P.; DELERUE-MATOS, C.; DE MORAES, J.; EATON, P. LEITE, J.R.S.A. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phytother. Res.** Published online in Wiley Online Library. 2017.

SABAH, A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M.J. Schistosoma mansoni : chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasitol.**, v.61, p. 294-303, 1986.



Secor WE. The effects of schistosomiasis on HIV/AIDS infection, progression and transmission. *Curr. Opin. HIV AIDS* 7(3), 254–259 (2012).

SILVA, V.G.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R.B.; CARVALHO, N.S.; PRUDENCIO, R.S.; ARAGAO, K.S.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPOS, S. A. ; VERAS, L. M. C.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J.R.S.A.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**. v. 76, p. 1071-1077, 2013.

SKORUPA, L. A. Revisão taxonômica de *Pilocarpus vahl* (Rutaceae). 1996. 426 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis.** v. 6; n 7, p. 411–425, 2006.

STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, accessed on June 17, 2016. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. organizadores. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associations 2002; 283- 308.

TSAI, J.C.; MCCLURE, C.A.; RAMOS, S.E.; SCHLUNDT, D.G.; PICHERT, J.W. Compliance barriers in glaucoma: a systematic classification. **Journal of Glaucoma**, v. 12; n. 5, p. 393-398. 2003.

VAN DER WERF, M.J.; DE VLAS, S.J.; BROOKER, S. *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.** v. 86; n 2–3, p. 125–139, 2003.

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

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.** v. 19: 2051-2058, 2012.

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.; CARVALHO JUNIOR, P.S.; 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**. v. 8, p. e66702, 2013.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. Produtos Naturais como Candidatos à Fármacos úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. **Quim. Nova**. v. 27, p. 655-660, 2004.

WARDROP, R.W.; HAILES, J.; BURGER, H.; READE, P.C. Oral discomfort at the menopause. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 67; n. 5, p. 535-40, 1998.

WATERMAN, P.G. Chemical Taxonomy of alkaloids. In: ROBERTS, M.F.; WINK, M. (organizadores). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. New York: Plenum, 87-107, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. **WHO**, 140 p, Switzerland. <http://apps.who.int> 2013 (2).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **WHO**, No. 8, 88, p. 81–88, 2013 (1).

ZACHARIASEN, R.D. Xerostomia and the diabetic patient. **The Journal of the Greater Houston Dental Society**, v. 67, p. 10-13, 1996.



## Capítulo II

Atividade da episopiloturina *in vivo* contra  
*Schistosoma mansoni*

## 4 Capítulo II – Atividade da episopiloturina *in vivo* contra *Schistosoma mansoni*

Parte dos dados deste capítulo estão publicados em um artigo no periódico internacional **Plos Neglected Tropical Diseases** (Qualis A1 Biotecnologia).

### **Atividade anti-helmíntica *in vivo* da episopiloturina contra vermes jovens e adultos de *Schistosoma mansoni***

(Guimaraes, M. A. et al. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, e0003656, 2015)

**Maria A. Guimarães**<sup>1</sup>, Rosimeire N. de Oliveira<sup>2</sup>, Leiz M. C. Vêras<sup>1,3</sup>, David F. Lima<sup>1,3,4</sup>, Yuri D. M. Campelo<sup>1,3</sup>, Stefano Augusto Campos<sup>1</sup>, Selma A. S. Kuckelhaus<sup>5</sup>, Pedro L. S. Pinto<sup>6</sup>, Peter Eaton<sup>7</sup>, Ana C. Mafud<sup>8</sup>, Yvonne P. Mascarenhas<sup>8</sup>, Silmara M. Allegretti<sup>2</sup>, Josué de Moraes<sup>9</sup>, Aleksandar Lolić<sup>10</sup>, Tatjana Verbić<sup>10</sup>, José Roberto S. A. Leite<sup>1\*</sup>

1 Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil;

2 Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil;

3 Programa de pós-graduação em Biotecnologia, RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil;

4 Colegiado Acadêmico de Medicina Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Paulo Afonso, Paulo Afonso, Bahia, Brasil;

5 Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UNB, Campus Dacy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

6 Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, São Paulo, Brasil;

7 UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal;

8 Grupo de Cristalografia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil;

9 Centro de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN/FACIG), Guarulhos, São Paulo, Brasil;

10 Faculdade de Química, Universidade de Belgrado, Belgrado, Servia.

\*Autor correspondente

E-mail: jrsaleite@gmail.com

*Todos os direitos autorais reservados a Plos Neglected Tropical Diseases*

## Resumo

A esquistossomose é uma doença grave e atualmente estima-se que afete mais de 200 milhões de pessoas no mundo todo. Devido ao uso intensivo de praziquantel, há uma crescente preocupação com o desenvolvimento de estirpes resistentes ao medicamento. Portanto, é necessário a busca e investigação por novos compostos com potencial efeito esquistossomicida. Este trabalho apresenta o efeito *in vivo* do alcaloide epiisopiloturina (EPI) contra vermes adultos e jovens de *Schistosoma mansoni*. Primeiramente a EPI foi purificada e seu comportamento térmico e parâmetros de solubilidade teóricas foram caracterizados. No estudo, os camundongos foram tratados com EPI 21 dias pós-infecção com as doses de 40 e 200 mg/kg e 45 dias pós-infecção com doses únicas de 40, 100 e 300 mg/kg. O tratamento com EPI a 40 mg/kg foi mais eficaz em vermes adultos quando em comparação com doses de 100 e 300 mg/kg. O tratamento com 40 mg/kg em vermes adultos reduziu a carga parasitária significativamente, levando à redução da hepatoesplenomegalia, reduziu a carga de ovos nas fezes e diminuiu o diâmetro dos granulomas. A microscopia eletrônica de varredura revelou alterações morfológicas no tegumento do parasita após o tratamento, incluindo a perda de características importantes. Adicionalmente, o tratamento *in vivo* contra vermes jovens com 40 mg/kg mostrou uma redução da carga parasitária total de 50,2%. Estudos histopatológicos foram realizados no fígado, baço, pulmão, rim e cérebro e EPI demonstrou ter uma DL50 de 8000 mg/kg. Portanto EPI mostra potencial para ser utilizado no tratamento contra esquistossomose. Esta é a primeira vez que a atividade esquistossomicida *in vivo* de EPI foi reportado.

### 4.1 Introdução

A esquistossomose é uma doença encontrada principalmente em regiões tropicais, cujos agentes infecciosos são *Schistosoma* spp., incluindo *S. mansoni* (WHO, 2012). Esta é atualmente uma das doenças tropicais negligenciadas mais amplamente encontradas, com altos níveis de incidência na Ásia, África e América Latina. Estudos têm mostrado que mais de 200 milhões de pessoas foram infectadas em todo o mundo e cerca de 800 milhões de pessoas são susceptíveis à infecção (STEINMANN et al., 2006). Atualmente o praziquantel (PZQ) é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*. Apresentando boa eficácia e baixa toxicidade, é atualmente o medicamento de referência para o tratamento

da esquistossomose (CIOLI et al., 1995; HAGAN et al., 2004; UTZINGER E KEISER, 2004; DOENHOFF et al., 2008;). No entanto, como PZQ é o único fármaco utilizado na terapia contra a esquistossomose, a preocupação com o desenvolvimento de resistência ao fármaco tem sido relatada (BOTROS E BENNETT,2007; CAFFREY, 2007).

A pesquisa de novos fármacos esquistossomicidas tem sido intensificada e levou ao estudo de substâncias naturais, tais como artemisinina e seus derivados (por exemplo, artemeter, artenusate), curcumina, fitol e epiisopiloturina (EPI) (XIAO, et al., 1996; UTZINGER et al., 2000; SHAOHONG, et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2009; De MORAES et al., 2014; VERAS, et al., 2012). Este estudo foi focado na EPI, um alcaloide imidazol extraído de *Pilocarpus microphyllus* que tem atividade *in vitro* contra *S. mansoni* na concentração 150 µg/mL, e em dose sub-letal impediu a postura dos ovos (VERAS et al., 2012). Além disso, este alcaloide mostrou potente atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2013), o que pode ajudar a combater os granulomas e a reação inflamatória causada pelos ovos de *S. mansoni*.

Apesar desta evidência promissora de atividade *in vitro*, não havia sido relatado ainda a atividade esquistossomicida *in vivo* de EPI. O presente estudo descreve pela primeira vez a atividade esquistossomicida *in vivo* de EPI contra as formas adulto e jovens de *S. mansoni*, também mostra dados de microscopia eletrônica de varredura revelando a ação do alcaloide no tegumento do parasita. Além disso, os efeitos do alcaloide na postura de ovos, redução de hepatoesplenomegalia, análise histopatológica e análise de granulomas no tratamento em camundongos, também são demonstrados.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Purificação e Caracterização de EPI

Esta etapa foi baseada de acordo com Véras et al., 2013 usando cromatografia líquida de alta eficiência- CLAE (SHIMADZU Prominence, SIL-10AF, CTO-20A, DGU-20A5, LC-6AD, CBM-20A, SPD-20A, Tokyo, Japan), e confirmação da massa molecular por espectrometria de massas (AmaZon SL, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

#### 4.2.2 Determinação do $pK_a$ potenciométrico

A constante de acidez de EPI foi determinada potenciometricamente em MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v:v), a  $T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$  e a uma força iônica constante ( $I = 0,1 \text{ M (NaCl)}$ ). Soluções de NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M) foram preparadas em MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) e potenciometricamente analisadas. EPI foi dissolvido em metanol e diluiu-se com o volume equivalente de solução aquosa 0,2 M NaCl ( $c_{\text{EPI}} = 9,7789 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). As titulações foram realizadas utilizando uma bureta Crison 24 2S equipados com CRISON 50 29 eletrodo de pH micro combinado (CRISON INSTRUMENTS, S.A. Espanha).

O eletrodo foi calibrado por meio de uma titulação com ácido forte-base forte, usando software de avaliação GLEE- eletrodo de vidro (GANS e O'SULLIVAN, 2000); padrão potencial  $E^0 = 395,7 \text{ mV}$ , fator de inclinação do eletrodo (inclinação real dividido pela inclinação Nernstiana ideal)  $s_f = 1.010$ , e  $Pk_w = 13,84 \pm 0,01$  obtidos como valores médios normais de quatro titulações.

Antes do início da titulação, 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de 0,1 M HCl foi adicionado a 4 mL da solução de EPI. Todas as sondas foram tituladas com 2.0  $\mu\text{L}$  incrementos da solução-padrão de 0,1 M NaOH na faixa de Ph de 2,9-11,2. Software HyperQuad 2008 (GANS, et al., 1996) foi usada para calcular o valor de constante de acidez ( $pK_a$ ) de quatro titulações repetidas.

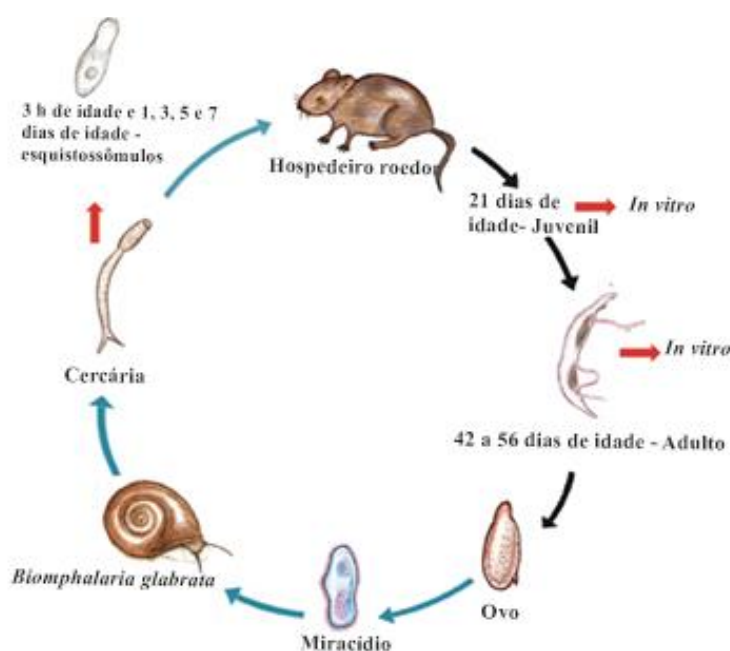
Um estudo teórico do  $pK_a$  foi realizada. O método ChemAxon (SZEGEZDI e CSIZMADIA, 2004; SZEGEZDI e CSIZMADIA, 2007), implementado no pacote MarvinSketch (Marvin 5.4.1.1, 2011, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), foi aplicado. Este método baseia-se em parâmetros físico-químicos calculados empiricamente (encargos principalmente parciais) que são obtidos a partir das equações de regressão sitio específica de ionização, que usa três tipos de parâmetros calculados (interações intermoleculares, cargas parciais e polarizabilidades) para determinar o  $pK_a$  de moléculas monoproticos. Além disso, calculou-se a solubilidade intrínseca para o composto, o qual é um parâmetro essencial. A predição usa um método fragmento-baseado que identifica diferença estrutural em fragmentos na molécula e calcula a sua contribuição para solubilidade. A implementação é com base no artigo de Hou et al., 2004 e que pode ser encontrada no pacote ChemAxon. Além disso, foram avaliadas as propriedades térmicas de EPI. A calorimetria de varredura diferencial DSC) e análise gravimétrica térmica (TGA) foram utilizados para determinar a perda de massa térmica, bem como para o estudo da decomposição térmica de EPI para determinar se é possível

que formas polimórficas estivessem presentes. A análise DSC / TGA e DSC simultânea foram realizados com uma massa inicial de amostra de 5 mg em cadinhos de alumina (90 IL). Um calorímetro SDT-Q600, permitindo medição simultânea da variação de peso e o fluxo de calor diferencial (TA Instruments) foi aplicado nestes estudos. Parâmetros experimentais para a curva TGA incluía a massa usada de 5 mg, aquecimento na taxa de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  sob fluxo de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ) e a temperatura final de  $1000^{\circ}\text{C}$

#### 4.2.3 Parasitas, Hospedeiros Intermediário e Definitivo

Neste estudo, a linhagem BH de *S. mansoni*, oriundo de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil foi utilizado. O ciclo de vida de *S. mansoni* foi mantido em caramujos *Biomphalaria glabrata* do Departamento de Biologia Animal, IB, UNICAMP (figura 7). Como hospedeiro definitivo, camundongos BALB/c fêmea, pesando  $\sim 20\text{ g}$  e 4 semanas de idade, foram previamente expostos e infectados com uma suspensão contendo aproximadamente 70 cercarias usando a técnica de imersão caudal, tal como descrito por Oliver e Stirewalt, 1952. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para a uso de animais (CEUA / UNICAMP, protocolo n° 2170-1), já que estavam de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo CEUA.

**FIGURA 7:** Esquema representativo do ciclo de *S. mansoni* mantido em laboratório. Fonte: Moraes, 2012.





#### 4.2.4 Tratamento *in vivo* com EPI

##### 4.2.4.1 Tratamento de camundongos infectados com vermes adultos.

Para o tratamento *in vivo* de vermes adultos, os animais foram tratados 45 dias pós-infecção e as doses-únicas de 40, 100 e 300 mg/kg de EPI foram administradas por via oral. Como medicamento comparativo, foi utilizado o praziquantel (PZQ) em dose-única de 40 mg/kg. A dose de 40 mg/kg foi selecionada com base em estudos anteriores que descrevem a atividade de PZQ em seres humanos (HOTEZ et al., 2007), e também porque é uma dosagem comumente prescrita para indivíduos infectados com a doença. As demais doses foram selecionadas com base em uma série de estudos da literatura que mostram testes com uso de doses na faixa de 100 a 400 mg/kg. Uma revisão de literatura publicada recentemente mostra essa variabilidade no uso de doses para testes *in vivo* de compostos contra esquistossomose (LAGO et al., 2017). Para ambos os tratamentos, as amostras foram solubilizadas em solução de tampão fosfato salino (PBS) com 0,1% de Tween-80 Polisorbato (Merck1). Quarenta e cinco dias após a infecção, os animais foram divididos em 5 grupos principais, com 10 animais cada: camundongos infectados e não tratados serviram como controle (Grupo I), os grupos tratados consistiram em camundongos tratados com EPI em doses únicas de 40, 100 e 300 mg/kg (Grupo II, III e IV, respectivamente), e camundongos tratados com PZQ na dose de 40 mg/kg (Grupo V). Todos os grupos de animais foram tratados por via oral. O grupo I consistiu de um grupo controle que recebeu apenas PBS. É importante mencionar que no experimento com EPI 100 mg/kg, três camundongos morreram.

##### 4.2.4.2 Tratamento de camundongos infectados com vermes jovens.

Para o tratamento *in vivo* contra vermes jovens, doses únicas de EPI de 40 e 300 mg/kg foram usadas. Vinte e um dias após a infecção, os animais foram divididos em 3 grupos principais, com 8 animais cada: camundongos infectados e não tratados serviram como controle (grupo I) e os grupos tratados consistiram de camundongos tratados com EPI em doses únicas de 40 e 300 mg/kg (Grupo II e III). Grupo I consistiu de um grupo tratado apenas com PBS. Os camundongos foram tratados por via oral na mesma forma descrita no item 4.2.4.1.

#### 4.2.5 *Estimativa da carga parasitária e dos ovos*

Os animais de todos os grupos foram eutanasiados 15 dias após o tratamento, utilizando deslocamento cervical e *S. mansoni* foram recuperados por perfusão do sistema porta-hepático e veias mesentéricas de acordo com Pellegrino e Siqueira de 1956. A porcentagem de redução da carga de ovos (WR) foi calculada de acordo com Delgado et al., 1992. A contagem dos ovos eliminados nas fezes foi realizada no dia da análise do tratamento. As fezes foram recolhidas antes da eutanásia e foram examinados, utilizando o método quantitativo de Kato-Katz (KATZ et al., 1972). As lâminas foram examinadas para ovos de *S. mansoni* com um microscópio óptico. Depois da perfusão do sistema portal, um fragmento do intestino (2 cm) foi cortado e processado para o oograma. Os ovos foram então contados e classificados de acordo com diferentes estágios de desenvolvimento (PELLEGRINO, et al., 1962).

#### 4.2.6 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Os parasitas foram inicialmente fixados em solução AFA, a 2:9:30:59 mistura de ácido acético, formaldeído, etanol (95%) e água destilada (MORAES, 2012). A solução de AFA foi removida e substituída com um fixador secundário, tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) em tampão de cacodilato de 100 mM, pH 7,3. A fixação secundária foi incubada durante 2 h com agitação suave. O  $\text{OsO}_4$  foi removido e substituído com cacodilato como acima duas vezes. O tampão de cacodilato foi então substituído com água ultrapura-duas vezes. As amostras foram então secas ao ar a partir de água sobre fita adesiva de carbono, revestida com ouro-paládio para a condutividade, e fotografada no MEV. O equipamento foi um FEI quanta 400 MEV, operando em modo elétrons secundários. As imagens das amostras foram obtidas com uma distância de trabalho de 10-15 mm e uma voltagem de aceleração de 15 kV. O detector de elétrons foi removido a partir do MEV para aumentar o campo de vista.

#### 4.2.7 *Histopatologia hepática e medição de granuloma*

Com relação à análise histológica, amostras de fígado (lobo esquerdo) foram retiradas a partir de três camundongos: grupo tratado e controle (infecção não tratada). As amostras foram processadas para histopatologia seguindo técnicas convencionais

(CLARK, 1981), corados com hematoxilina e eosina e analisados com o fotomicroscópio Leica DM500-ICC50 HD. As medições foram feitas apenas para granulomas contendo um único ovo em seus centros. O diâmetro médio ( $\mu\text{M}$ ) de cada granuloma foi obtido por medição de dois diâmetros das lesões em ângulos retos entre si com a ajuda de um micrômetro ocular (MAHMOUD et al., 2002). A porcentagem de ovos degenerados foi calculada a partir do número de miracídios degenerados (acelular ou parcialmente ou completamente degenerada), utilizando a fórmula: média de número de ovos degenerado / média do número de granulomas X 100 (BOTROS et al.; 2003).

#### 4.2.8 Estudos de toxicidade aguda e histopatológicos

Para a determinação da dose letal capaz de matar 50% de animais (DL50), camundongos swiss fêmeas ( $n = 4$ ) foram utilizados, com idades compreendidas entre  $3,5 \pm 0,5$  meses e pesando  $29,8 \pm 1,3$  g. Concentrações mais elevadas do que a dose terapêutica de 40 mg/kg, que foi previamente identificado no tratamento de animais infectados com *S. mansoni* foram utilizados no ensaio. Inicialmente, EPI foi diluído em 10% de DMSO e, posteriormente, em solução salina a 0,9%. As concentrações (0, 70, 130, 270, 530, 1070, 2130, 4270 e 8000 mg/kg) foram calculadas com base na média do peso dos animais e administradas por via intraperitoneal. Durante o ensaio, os animais foram monitorados periodicamente para identificar sinais clínicos visíveis no coração (ritmo cardíaco anormal), pulmão (taxa anormal respiratória) e sistema motor (ataxia e/ou prostração). Os estudos histopatológicos foram realizados no fígado, baço, pulmão, rim e cérebro. Alguns animais morreram devido à administração da concentração mais elevada (8000 mg/kg), enquanto que o resto deles foram eutanasiados 7 dias após a injeção intraperitoneal do fármaco. As amostras de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina, e um microscópio com uma ampliação de 100X foi utilizado. (KÜCKELHAUS, et al., 2007).

#### 4.2.9 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com software Graphpad Prism (versão 5.0). O teste de Dunnet foi utilizado para analisar a significância estatística das diferenças entre a média dos valores experimental e controle e a aplicação do teste de Tukey para comparações múltiplas com o nível de significância fixado em  $p < 0,05$ .

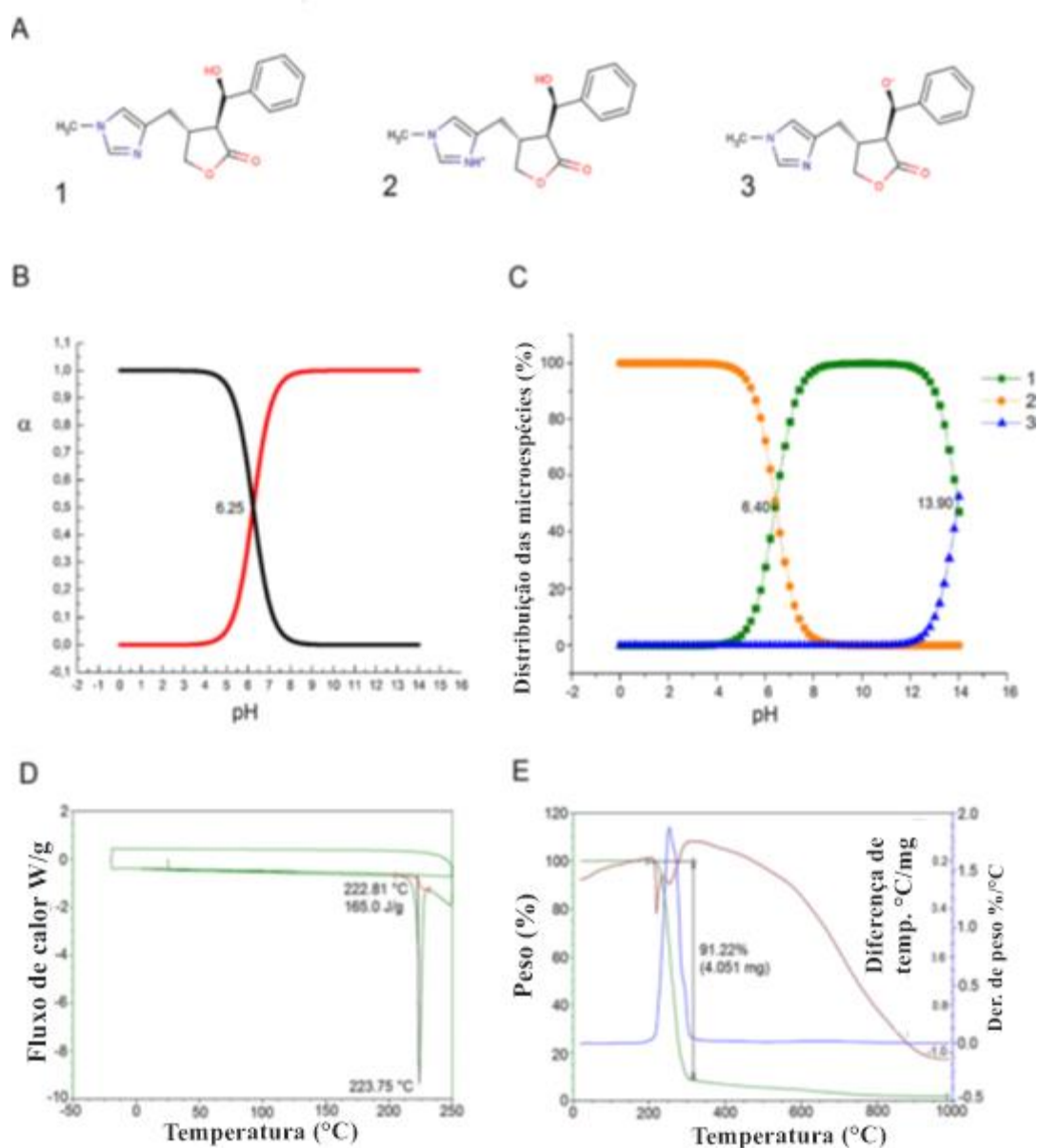
### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Caracterização da EPI

O tempo de retenção característico obtido por CLAE e os fragmentos gerados por meio de espectrometria de massa estão de acordo com os dados descritos anteriormente (VOIGTLANDER et al., 1978; VÉRAS, et al., 2013). De acordo com o valor potenciométrico de pKa determinado ( $pK_a 6,25 \pm 0,05$ ) e do diagrama de distribuição de acordo com a fig. 8B, no pH 7,4, 93,5% de EPI está presente na sua forma molecular e 6,5%, sob a forma protonada (Figura 8A e 8B).

O cálculo de pKa para a EPI apresenta formas iônicas diferentes mostradas na Figura 8B. Ao traçar as curvas de titulação teóricas, isto é, a razão entre as formas ionizadas e neutras em comparação com o pH (Figura 8C), pode-se identificar as espécies iônicas que estão presentes na mistura a cada valor de pH. A partir disto identificamos os valores de pKa previstos como  $pK_{a1} = 6,4$  e  $pK_{a2} = 13,9$ . A distribuição das microespécies à pH= 7,40 foi 1 = 90,55%, 2 = 9,45% e 3 = 0,0%, além disso, observamos que em pH mais elevados a EPI aparentemente está presente na sua forma molecular. A solubilidade também foi calculada e os resultados mostram que EPI possui uma elevada solubilidade aparente em água a pH 7,4 (superior a 0,06 mg/mL), com solubilidade intrínseca igual a -1.76 unidades logS. A análise termogravimétrica da EPI indica que ocorre degradação em uma etapa a uma temperatura elevada (Figura 8D). A única etapa envolve um decaimento de massa de 91,22% (calculado: 4,051 mg; início: 222,81°C) associado com um sinal DTA endotérmico (Figura 8E.).

**FIGURA 8:** Formas neutras e iônicas de EPI. 1- Forma neutra; 2- Forma catiônica; 3- forma aniônica (A). Determinação potenciométrica do pKa (B). Ilustração dos valores preditos de pKa da EPI usando o método ChemAxon. (C). DSC (D) e DSC-TGA (E) dados que ilustram a degradação térmica que ocorre em torno de 220°C, em uma única etapa.



#### 4.3.2 Efeito da EPI em *S. mansoni* juvenis

Os camundongos tratados com a dose de 40 e 300 mg/kg de EPI, após 21 dias de infecção mostraram diferenças significativas ( $P < 0,01$  e  $P < 0,01$ ) em relação à redução da carga total de vermes. Os tratamentos realizados contra vermes juvenis mostraram uma redução moderada da carga parasitária total de 50,2% (DP: 14,9) e 46,3% (DP: 16,2), quando os camundongos receberam EPI a 40 e 300 mg/kg, respectivamente, em comparação com o grupo controle infectado e não tratado. Na tabela 1 estão resumidos todos os resultados.

**Tabela 1.** Efeitos da EPI contra *S. mansoni* juvenis (tratados 21 dias após a infecção)

Amostra	Dose	Média da carga parasitária $\pm$ SEM (fígado e porta-mesenterica)				Redução da carga parasitária total
		Machos	Fêmeas	Casais	Total de Vermes	
Controle	0 (PBS)	10,2 $\pm$ 2,8	3,9 $\pm$ 0,6	9,6 $\pm$ 1,8	32,9 $\pm$ 3,7	-
EPI	40 mg/kg	2,2 $\pm$ 0,5*	2,4 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,7	16,4 $\pm$ 1,7**	50,2%
EPI	300 mg/kg	6,8 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,3***	5,0 $\pm$ 1,0*	17,6 $\pm$ 1,4**	46,3%

Os valores são apresentados como média  $\pm$  SEM. Número de animais/grupo = 8.

Os asteriscos indicam que a diferença em relação ao controle foi significativa com \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*  $P < 0,05$ .

#### 4.3.3 Efeito da EPI em *S. mansoni* adulto

A eficácia de EPI foi testada na fase adulta de vida do parasita em um hospedeiro mamífero experimental. Após 45 dias de infecção, vermes machos e fêmeas já tinham amadurecido e acasalado, e os ovos foram encontrados no fígado, intestino e fezes. Em camundongos infectados por *S. mansoni*, houve uma redução na carga de vermes quando foi feito o tratamento oral com EPI, como mostrado na Tabela 2. Após 45 dias de infecção, os tratamentos realizados com EPI em doses de 40, 100 e 300 mg/kg reduziram a carga de vermes dos camundongos a 70,0% ( $P < 0,001$ ) (DP: 15,7), 39,0% ( $P < 0,01$ ) (DP: 14,1) e 46,7% ( $P < 0,001$ ) (DP: 9,2), respectivamente. O tratamento com 40 mg/kg de PZQ mostrou redução significativa na carga de vermes total em comparação com o controle não tratado de 62,0% ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 2.** Efeitos da EPI contra *S. mansoni* adultos (45 dias após a infecção).

Amostra	Dose	Média da carga parasitária ± SEM (fígado e porta-mesenterica)				Redução da carga parasitária total
		Machos	Fêmeas	Casais	Total de vermes	
Controle	0 (PBS)	12,9±1,1	9,9±1,2	13,7±0,9	50,2±2,4	-
PZQ	40 mg/kg	7,6±2,4	0,9±0,4***	5,2±1,0***	18,9±2,7***	62,0%
EPI	40 mg/kg	2,6±0,6***	2,2±0,7***	5,3±0,9***	15,2±2,5***	70,0%
EPI	100 mg/kg	7,1±1,0**	6,8±1,3*	8,7±0,7**	31,4±2,7***	39,0%
EPI	300 mg/kg	12,1±1,1	3,0±0,3***	6,1±0,8***	27,4±1,7***	46,7%

Os valores são apresentados como média ± SEM. Número de animais/grupo = 10. No grupo tratado com 100 mg/kg, 3 animais morreram.

Os asteriscos indicam que a diferença em relação ao controle foi significativa com \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01 e \* P<0,05.

#### 4.3.4 Efeito da EPI na eliminação de ovos e no peso do fígado e baço

O efeito da EPI em fases de desenvolvimento do ovo (oograma padrão) e a carga de ovos nas fezes em 45 dias pós-infecção é mostrado na Tabela 3. No que diz respeito ao número de ovos excretados nas fezes, os resultados mostraram reduções de 80% (DP:9,1), 45,7% (DP:22) e 59,6% (DP:35,2) em resposta aos tratamentos com 40, 100 e 300 mg/kg de EPI, respectivamente, para o PZQ a redução foi de 77% com 40 mg/kg. Podemos observar que nos grupos tratados com EPI em 40, 100 e 300 mg/kg, a porcentagem de ovos imaturos foi significativamente reduzida a 24% (DP:13,6), 16,6% (DP:11,1) e 56,8% (DP:13,7) do número total de ovos, em comparação com o controle infectado e não tratado, nos quais 79% (SD: 6,1) dos ovos eram imaturos. Já no tratamento com o PZQ a porcentagem de ovos imaturos foi significativamente reduzida a 46% em comparação com o controle. O oograma também mostrou aumento significativo na porcentagem de ovos mortos nos camundongos tratados com 40, 100 e 300 mg/kg de EPI, os resultados mostram 36% (DP:9,9), 24% (DP:5,6) e 12% (DP:6,1), respectivamente em comparação com o grupo controle (2%) (SD: 1,2). No tratamento com PZQ foi observado 4% de ovos mortos, não apresentando diferença significativa em relação ao controle.

**Tabela 3.** Efeito do tratamento com EPI na oviposição dos adultos, 15 dias pós-tratamento (45 dias após a infecção).

Amostras	Dose (mg/kg)	Redução do número de ovos nas fezes	Porcentagem de ovos em cada etapa de desenvolvimento		
			<b>Imaturos</b>	<b>Maduros</b>	<b>Mortos</b>
Controle	PBS	-	79,0%	19,0%	2,0%
PZQ	40 mg/kg	77,0% ***	46,0% ***	50,0%	4,0%
EPI	40 mg/kg	80,0% ***	24,0% ***	40,0%	36,0% ***
EPI	100 mg/kg	45,7%	16,6% ***	59,4%	24,0% ***
EPI	300 mg/kg	59,6% ***	56,8% ***	31,2%	12,0% ***

Número de animais/grupo = 10. Grupo tratado com 100 mg/kg, 3 animais morreram.

Os asteriscos indicam que a diferença em relação ao controle foi significativa com \*\*\*  $P < 0,001$ .

Além disso, o tratamento com EPI 40 mg/kg diminui a patologia no fígado e baço. Uma significativa redução do peso do fígado ( $P < 0,01$ ) e no baço ( $P < 0,01$ ) do grupo tratado com EPI em comparação com o controle infectado e não tratado foi demonstrado (Tabela 4). O tratamento com EPI 100 mg/kg reduziu significativamente apenas o peso do fígado ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, nos camundongos tratados com EPI 300 mg/kg não foi observado qualquer redução no peso destes órgãos (Tabela 4), assim como nos camundongos tratados com PZQ.

Resumindo, EPI diminui significativamente os ovos de *S. mansoni* e a carga de vermes, bem como hepatoesplenomegalia.



**Tabela 4.** Efeito do tratamento com EPI no peso relativo dos órgãos.

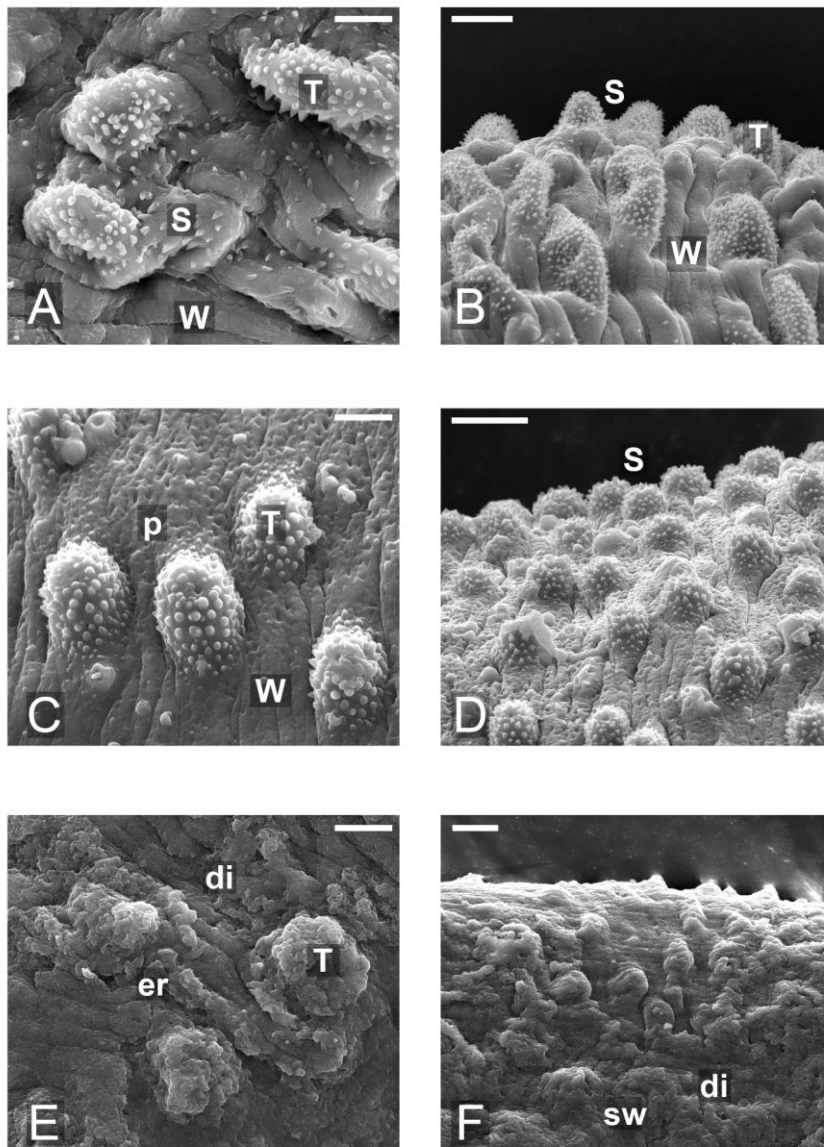
<b>Amostras</b>	<b>Peso relativo do fígado</b>	<b>Peso relativo do baço</b>
<b>Controle</b>	1,88 ± 0,098	0,61 ± 0,034
<b>PZQ 40 mg/kg</b>	1,93 ± 0,06	0,70 ± 0,04
<b>EPI 40 mg/kg</b>	1,60 ± 0,03**	0,45 ± 0,03**
<b>EPI 100 mg/kg</b>	2,00 ± 0,06*	0,61 ± 0,01
<b>EPI300 mg/kg</b>	1,78 ± 0,05	0,54±0,02

Os asteriscos indicam que a diferença em relação ao controle foi significativa com \*\* P<0,01 e \* P<0,05.

#### 4.3.5 Efeito da EPI sobre as alterações tegumentares

As alterações do tegumento na superfície de *S. mansoni* foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Nos parasitas do grupo controle (não tratados), os tubérculos e as espinhas pareciam intactos e com alta ampliação, a superfície mostrou espinhas e sulcos entre os tubérculos que têm uma aparência rugosa e comportam as papilas sensoriais (Figura 9A e B). O tegumento foi alterado pelo tratamento dos animais com PZQ (Figura 9C e D). Os tubérculos pareciam inchados, e enquanto as espinhas nos tubérculos ainda eram visíveis, eram bastante arredondadas em comparação com o controle, como se observa na imagem de alta ampliação (Figura 9C). Com uma baixa ampliação, é possível ver que a estrutura arredondada do tegumento foi mantida, embora a superfície tenha aparecido um pouco inchada. O tegumento foi drasticamente danificado após o tratamento com EPI, as espinhas estavam completamente ausentes e os tubérculos gravemente danificados (Figura 9E e F). As mudanças incluíram o inchaço e a perda de espinhos nos tubérculos, além de destruição e erosão. Todos os vermes examinados mostraram encolhimento com enrugamento e extensa descamação ao redor dos tubérculos no tegumento expondo tecidos subtegumentais (Figura 9E). Em comparação com os parasitas tratados com praziquantel, a estrutura geral dos vermes tratados com EPI mostrou mudanças muito maiores, com crescimentos tegumentais já não visíveis em baixa resolução (Figura 9F.), com menos tubérculos intactos visíveis e sem espinhas.

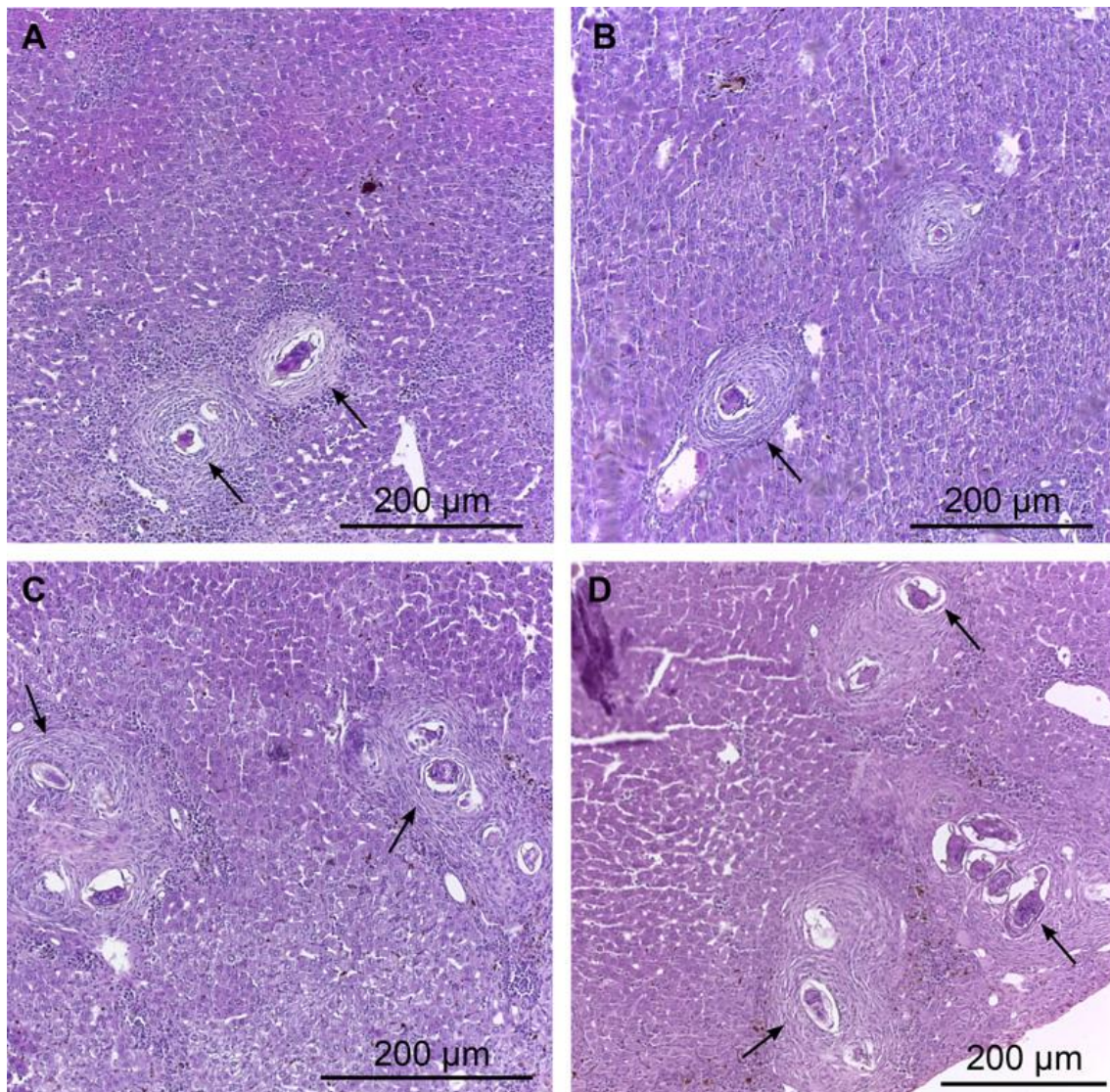
**FIGURA 9:** Microscopia eletrônica de varredura da região dorsal do meio do corpo de vermes machos de *S. mansoni* recuperados 45 dias após a infecção, coletados por perfusão do sistema porta-hepático. A e B: vermes não tratados (controle). C e D: vermes de camundongos tratados com 40 mg/kg de PZQ. E e F: vermes de camundongos tratados com 40 mg/kg de EPI. As barras de escala em A, C e E mostram 5  $\mu$ m, e em B, D e F mostram 10  $\mu$ m. (A): superfície tegumental dorsal mostrando tubérculos (T), espinha apical e rugas paralelas (w). (B) Maior ampliação de (A) mostrando os mesmos recursos que aparecem regularmente em toda a superfície. (C e D): MEV de um verme macho após o tratamento com PZQ. Alguns dos tegumentos são perfurados (p). (E) e (F): MEV do verme macho após o tratamento com EPI: os tubérculos (T) e o tegumento lateral se desintegraram (di). A superfície tegumental dorsal mostra inchaço (sw) e erosão (er) da superfície com a exposição do tecido subcutâneo.



#### 4.3.6 *Histopatologia hepática e medição granuloma*

Considerando que a dose de 40 mg/kg conduziu a uma maior redução da carga parasitária, avaliou-se a presença de granulomas no fígado de camundongos tratados com esta dose. Um estudo detalhado das seções histológicas da mesma área do fígado de camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* e tratados com a dose de 40 mg/kg de EPI (Figura 10A e B) e o controle não tratado (Figura 10C e D) permitiram a identificação de granulomas em várias fases de evolução contendo infiltrado inflamatório composto de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos ao redor do ovo e mais externamente linfócitos e fibroblastos. Baseado na classificação de Lenzi et al. (1998) foi identificado, principalmente em secções histológicas de fígado, granulomas contendo pequeno infiltrado inflamatório desorganizado ao redor do ovo (fase pré-granulomatosa de reação inicial), infiltrado inflamatório difuso em maior número (fase pré-granulomatosa exudativa), infiltrado inflamatório frouxo e células necróticas ao redor do ovo (fase necrótico-exudativa), deposição inicial e circunferencial de fibras de colágeno pelos fibroblastos que margeiam as células inflamatórias (fase produtiva) e faixa espessa de fibras de colágeno que envolve o ovo ou os restos dele (fase de cura por fibrose).

**FIGURA 10:** Fotomicrografias de granulomas hepáticos de camundongos 45 dias após a infecção. A e B: fígado de animais infectados e tratados (40 mg/kg). Existe a presença da fase necrótica exsudativa com infiltrado inflamatório livres (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) e zonas com células necróticas em torno do ovo. C e D: fígado de animais infectados e não tratados, os granulomas foram encontrados na região periportal. Diferentes fases de evolução do granuloma, incluindo pré-granulomatosa exudativa, necrótica exudativa, produtiva e cura por fibrose foram observados. As setas indicam a presença de células inflamatórias.



Foi observado diminuição no tamanho dos granulomas nos fígados do grupo tratado com EPI. Após a análise das imagens, foi visto que o diâmetro médio dos granulomas hepáticos foi significativamente menor ( $P < 0,01$ ) no grupo tratado com EPI, em comparação com o grupo controle infectado e não tratado (Tabela 5). Além disso, a maioria dos ovos de *S. mansoni* encontrados nos animais tratados com EPI mostrou degeneração severa (71% contra 50% para o controle).

**Tabela 5.** Diâmetro do granuloma ( $\mu\text{M}$ ) no fígado dos camundongos dos grupos infectados tratados e não tratados 45 dias após a infecção (vermes adultos).

Amostras	Média do diâmetro dos granulomas ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM	Número de granulomas
Controle infectado e não tratado	243.5 $\pm$ 3.23	68
EPI 40 mg/kg	194.0 $\pm$ 6.95**	30

Diferença foi significativa \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.3.7 Estudos de toxicidade aguda e histopatológicos

A toxicidade e estudos histopatológicos foram realizados para avaliar o perfil toxicológico de EPI *in vivo*. As concentrações testadas eram consideravelmente maiores do que as doses terapêuticas utilizadas para avaliar os efeitos sobre *S. mansoni*, uma vez que a toxicidade de PZQ é baixa, com uma  $DL_{50}$  de cerca de 2.400 mg/kg (GROL, 1984).

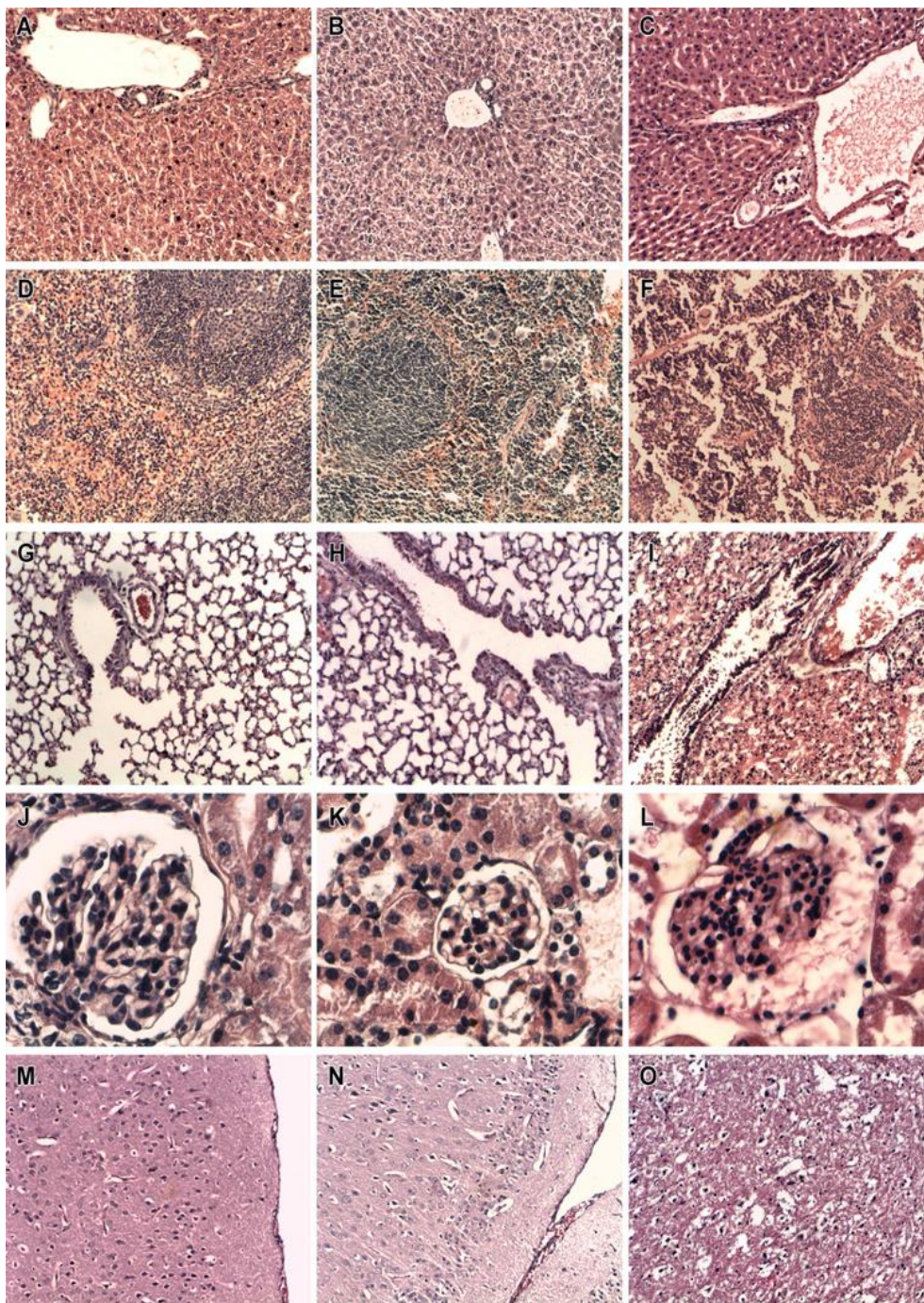
A injeção intraperitoneal de EPI presente em uma concentração igual ou superior a 530 mg/kg causou alterações clínicas visíveis, tais como taquicardia, taquipneia, ataxia e prostração. Depois de um período variando desde 15 minutos até 6 horas, essas alterações foram espontaneamente revertidas, eventualmente tornando-se imperceptível para observação, de uma forma dependente da dose. Na concentração máxima de 8000 mg/kg morreram 50% dos animais com 18 horas após a injeção intraperitoneal do fármaco.

A figura 4 mostra imagens que ilustram a histologia do fígado (Figura 11A, B e C), baço (Figura 11D, E, F), pulmão (Figura 11G, H, I), rim (Figura 11J, K, L) e cérebro

(Figura 11M, N, O), tratou-se com 0,0 (primeira coluna), 530 (segunda coluna) ou 8000 (terceira coluna) mg/kg de EPI. A análise histopatológica revelou que os animais tratados com a concentração mais elevada (8000 mg/kg) mostraram congestão generalizada e edema nos cortes histológicos do pulmão, baço, rim e cérebro; depressão na polpa vermelha e inúmeras células que sofreram apoptose no baço (Figura 11F), bem como danos no endotélio dos vasos no fígado também foram observados (Figura 11C). Outros efeitos observados após a administração de 8.000 mg/kg incluíram hemorragia intra-alveolar, deposição de fibrina no pulmão (Figura 11I.) e degeneração hidrópico focal no rim (Figura 11L.); não foram observadas alterações morfológicas no parênquima do fígado (Figura 11C). Os animais tratados com 530 mg/kg de EPI mostraram depressão focal da polpa vermelha (Figura 11E), depois de sete dias após a injeção intraperitoneal do fármaco, ao passo que os outros órgãos não apresentaram alterações morfológicas (Figura 11B, H, K, N). O grupo controle apresentou morfologia normal em todos os órgãos analisados (Figura 11A, D, G, J, M).



**FIGURA 11:** Estudo histopatológico das seções dos órgãos de diferentes grupos de camundongos. Comparação entre a histologia do: fígado (A, B, C), baço (D, E, F), pulmão (G, H, I), rim (J, K, L), e cérebro (M, N, O) obtido a partir de camundongos swiss (n = 4) tratados com 0,0 (primeira coluna), 530 (segunda coluna) ou 8000 (terceira coluna) mg/kg de EPI. A primeira e a segunda coluna referem-se a camundongos eutanasiados 7 dias após o ensaio a terceira representa órgãos de animais que morreram devido à administração de concentrações mais elevadas do fármaco.



#### 4.4 Discussão

O uso generalizado de PZQ para o tratamento e controle da esquistossomose pode selecionar parasitas resistentes aos medicamentos (FALLON e DOENHOFF, 1994). Em países como o Egito, um número crescente de pacientes exibiu resistência ao tratamento com PZQ, aparentemente devido, em alguns casos, a resistência inerente a cepas em particular, e em outros casos, a uma resposta imune do hospedeiro infectado, o que reduz a eficácia da quimioterapia (ISMAIL et al., 1999). Portanto, a descoberta de novos agentes anti-parasitários para tratar a esquistossomose é uma via importante de investigação. Moléculas isoladas de plantas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores ao longo dos anos para o desenvolvimento de novos fármacos, devido à variedade de suas estruturas químicas e sua ampla gama de atividades biológicas. A descoberta de produtos naturais que podem ser usados no tratamento da esquistossomose está sendo um grande desafio na era da química combinatória e genômica (MORAES, 2012).

Nós avaliamos a atividade de uma dose única de EPI contra um modelo de laboratório de *S. mansoni in vivo*, em primeiro lugar, para determinar a toxicidade aguda (DL50) e também para determinar o efeito de diferentes concentrações de EPI (40, 100 e 300 mg/kg) em camundongos infectados com *S. mansoni*. Os resultados para a toxicidade aguda demonstraram que a injeção intraperitoneal de EPI presente em uma concentração igual ou superior a 530 mg/kg causou alterações clínicas visíveis, tais como taquicardia, taquipneia, ataxia e prostração, os quais foram revertidos espontaneamente após 6 horas. O tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* causou reduções significativas na carga de vermes, na carga de ovos nas fezes, bem como na frequência de estágios de desenvolvimento dos ovos e redução da hepatoesplenomegalia. O efeito sobre a carga de vermes com doses únicas de 40 e 100 mg/kg de EPI mostrou que não houve diferença significativa na susceptibilidade entre vermes adultos machos e fêmeas. No entanto o tratamento com 300 mg/kg de EPI mostrou maior sensibilidade pelos vermes fêmeas. Algumas diferenças de susceptibilidade relacionada com a dose encontram-se descritos na literatura. Por exemplo, alguns estudos (GONNERT e ANDREWS, 1977; MEHLHORN et al., 1981; PELLEGRINO et al., 1997; ISMAIL et al., 1999) descreveram que doses subcurativas de PZQ atuam igualmente em machos e fêmeas, sem diferenças significativas na sensibilidade terapêutica entre os sexos. Mas Delgado et al. (1992) também observaram que a concentração *in vivo* de 250 mg/kg de PZQ atua



preferencialmente em fêmeas deste parasita, assim como o que foi visto neste estudo. Outros trabalhos com fármacos esquistossomicidas também têm demonstrado que vermes fêmeas tem maior susceptibilidade do que vermes machos (BOTROS et al., 2003; KEISER et al., 2009; MITSUI et al., 2009; MORAES, 2012;).

O tratamento *in vivo* contra vermes imaturos de *S. mansoni* modificou a proporção entre parasitas machos e fêmeas. Os tratamentos com doses de 40 e 300 mg/kg mostraram uma redução moderada da carga de vermes, o que não teve aumento significativo nas concentrações mais elevadas. (50,2% com SD: 14,9 e 46,3% com SD: 16,2, respectivamente). Utzinger et al. (2003) observaram que os vermes juvenis não eram suscetíveis a PZQ. Provavelmente, o efeito da EPI contra vermes jovens pode ser uma vantagem em relação a PZQ.

No final do tratamento, o peso do fígado e do baço de camundongos infectados e tratados com EPI 40 mg/kg foi menor do que o dos camundongos infectados e não tratados. As propriedades anti-inflamatórias de EPI podem ter ajudado neste efeito, pois a esquistossomose é uma doença inflamatória e já foi previamente descrito por Silva et al., 2013 que EPI pode atuar por exemplo sobre citocinas pró-inflamatórias. Mas, esta redução não aconteceu nas doses de 100 e 300 mg/kg. Dado o fato de *S. mansoni* levar à reação inflamatória granulomatosa grave no fígado, um composto com propriedades anti-inflamatórias pode ser de grande interesse no tratamento desta infecção. No caso do tratamento com EPI, a consequência foi uma redução do número e tamanho dos granulomas no fígado e, em seguida, uma redução de hepatoesplenomegalia. Os tratamentos com doses de 100 e 300 mg/kg, não apresentaram o mesmo resultado em comparação com 40 mg/kg.

Curiosamente, olhando para os dados da carga total de vermes (Tabela 1), foi obtido maior diminuição na carga de vermes com 40 mg/kg em comparação com 100 ou 300 mg/kg. As diferenças nas cargas de vermes entre as duas concentrações superiores não foram significativas, embora a diminuição em comparação com o controle em ambos os casos, foi significativa, apesar dessa diminuição ter sido ainda menor que a observada com uma dose de 40 mg/kg. Além disso, considerando-se a tabela 2, vemos que uma dependência da dose semelhante pode ser observada no efeito sobre a postura de ovos. Observou-se que as doses de 100 e 300 mg/kg conduzem a uma redução significativa na oviposição, mas um efeito maior foi obtido com a dose menor de 40 mg/kg. Embora uma relação dose-resposta inversa não sejam desconhecidas, eles são incomuns. Neste caso, a razão para isto pode estar relacionada com o método de administração. As doses mais

elevadas podem conduzir a precipitação no intestino, levando a uma insuficiência na absorção. Um objetivo futuro muito importante é determinar a farmacocinética desse fármaco no modelo, para ajudar a explicar estes dados. Outras experiências futuras também poderiam analisar doses ainda menores.

Embora não nos foi possível observar uma toxicidade significativa para estas condições de tratamento, 3 animais morreram após tratamento com 100 mg/kg. A partir deste trabalho aparentemente o tratamento com EPI em concentrações superiores a 40 mg/kg, dentre as doses deste estudo, não oferece quaisquer vantagens neste modelo.

Realizou-se uma comparação entre o número de ovos imaturos, maduros e mortos presentes nos fragmentos intestinais (45 dias após a infecção) de hospedeiros-tratados e não tratados. Os resultados demonstraram uma redução significativa na porcentagem de ovos imaturos no tecido intestinal dos animais tratados em todas as doses, quando comparado com o grupo controle infectado e não tratados.

A diminuição na porcentagem de ovos imaturos nos camundongos tratados provavelmente resulta de uma diminuição da carga parasitária e um efeito sobre a aptidão reprodutiva de *S. mansoni*. Provavelmente, o aumento nos ovos maduros em comparação com os imaturos, aconteceu como resultado da oviposição anterior. Os resultados aqui apresentados relativos à redução de ovos correspondem às observadas em outros estudos sobre os efeitos de diferentes compostos em *S. mansoni* (De OLIVEIRA et al., 2014; De MORAES et al., 2014). A redução na oviposição é bastante importante para o uso terapêutico, uma vez que o ovo é responsável pela transmissão do parasita e manutenção do seu ciclo biológico. Além disso, a patologia associada com a esquistossomose humana é principalmente devido ao grande número de ovos que ficam presos nos tecidos do hospedeiro (GRYSEELS et al., 2006).

Além disso, avaliou-se o efeito da EPI na carga dos ovos. O alcaloide reduziu significativamente ( $P < 0,001$ ) o número de ovos por grama de fezes em comparação com o controle. Esta notável redução na contagem de ovos nas fezes poderia estar relacionada à diminuição da carga parasitária. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes et al., 2014, em estudos com phytol.

Uma vez que a dose de 40 mg/kg levou a uma maior redução da carga parasitária, avaliou-se a presença de granulomas no fígado de camundongos tratados com esta dose. Os fígados dos camundongos tratados com EPI apresentaram redução do diâmetro dos granulomas e uma arquitetura lobular típica preservada. Eosinófilos são conhecidos por desempenhar um papel importante na destruição do ovo tanto *in vitro* (JAMES e

COLLEY, 1978) e *in vivo* (OLDS e MAHMOUD, 1980). O melhoramento da patologia hepática e a presença de pequenos granulomas com eosinófilos predominantes como resultado da destruição acelerada do ovo após administração repetida de antígenos solúveis dos ovos do parasita (SEA) já foram relatados (HASSANEIN et al., 1997). Portanto, existe a possibilidade de que o aumento no número de ovos degeneradas, bem como a diminuição do diâmetro de granulomas após o tratamento com EPI ocorreu devido a intervenções imunológicas e ações imunomoduladoras. Um efeito semelhante foi mostrado por Miranda et al., 2013 em estudos com o extrato alcaloídico de frutos de *Solanum lycocarpum*. Este extrato mostrou efeito imunomodulador em camundongos infectados com *S. mansoni*.

O tegumento é um alvo principal para estudos de fármacos, alterações na topografia da superfície dos vermes tem sido estudada por vários pesquisadores (MANNECK, et al., 2010; EISSA, et al., 2011; MOSTAFA et al., 2011). As doses de EPI testados exibiram um efeito grave sobre o tegumento de *S. mansoni* adulto que compreende inchaço dos tubérculos e sulcos, seguido de perda de espinhos. Subsequentemente, os tubérculos e as nervuras foram quebradas e começaram a erodir, levando à formação de lesões. Eventualmente, isso resultou em descamação do tegumento sobre grandes áreas da superfície do corpo. Especula-se que as alterações morfológicas observadas no tegumento pode ser um mecanismo pelo qual EPI leva à morte dos vermes. O dano ao tegumento ao longo do corpo do verme poderia ter destruído sua defesa permitindo subsequente ataque pelo sistema imunológico. Os mecanismos envolvidos na morte podem ser dependentes de anticorpos do hospedeiro ou efeito direto, (De MORAES et al., 2014). Com base na premissa de que a tioredoxina-glutationa redutase (TGR) é uma enzima essencial para a sobrevivência do parasita *S. mansoni* (KUNTZ et al., 2007), nós fizemos um acoplamento de EPI com TGR, mas EPI não se ligou a enzima e, portanto, supõe-se que este não é o alvo. Assim, mais estudos são necessários para elucidar os múltiplos mecanismos de ação da EPI. Este será o tema de estudos futuros.

A avaliação toxicológica de novos fármacos é um dos passos decisivos do desenvolvimento do fármaco. Filho et al., 2002 avaliaram três derivados de oxamniquina como novos agentes esquistossomicidas quando administrado a camundongos. Oxamniquina tem DL<sub>50</sub> de 1300 mg/kg, e os três novos compostos derivados tiveram alta toxicidade, com valores de DL<sub>50</sub> menor que 1200 mg/kg. PZQ, quando administrado a camundongos, tem uma DL<sub>50</sub> de cerca de 2400 mg/kg (LENZI et al., 1998). No nosso caso, a EPI mostrou ter uma DL<sub>50</sub> muito maior (8000 mg/kg) e foi observado que os

camundongos têm uma alta resistência aos efeitos tóxicos de EPI. As alterações histopatológicas mais drásticas causadas pela EPI, como congestão generalizada e edema nos cortes histológicos do pulmão, baço, rim e cérebro; depressão na polpa vermelha e inúmeras células em apoptose no baço; hemorragia intra-alveolar e deposição de fibrina no pulmão; degeneração hidrópica focal do rim e os danos no endotélio dos vasos no fígado pode ser responsável pela toxicidade à concentração mais elevada de 8000 mg/kg. Abaixo de 530 mg/kg EPI não causou nenhuma toxicidade e não causou alterações clínicas visíveis ao todo, o que potencialmente poderia ser uma vantagem considerável para o seu uso clínico. Embora nesta fase inicial, ainda não realizamos testes experimentais de genotoxicidade, foi realizado um exercício de previsão teórica. Osiris Property Explorer (SANDER et al., 2009) é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a pontuação-fármaco de compostos potenciais que possam atender às necessidades de um fármaco candidato. A avaliação do risco de toxicidade é prevista por um processo com base na comparação com um conjunto pré-calculado de fragmentos estruturais que vêm dos grupos tóxicos do banco de dados RTECS (Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas), mantido pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH). Dados das pontuações de toxicidade gerados incluem irritação primária; efeitos mutagênicos; efeitos reprodutivos e tumorigênicos; toxicidade aguda e toxicidade de dose múltipla. Quando EPI e os seus estereoisômeros foram avaliados através desta ferramenta (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> acessado em 01 de fevereiro de 2015), não foram encontrados riscos de toxicidade. Da mesma forma, nós também comparamos as características estruturais de EPI com pan-ensaios de compostos de interferência ou grupos PAINS, promíscuos, e atividades de ensaio interferente, e não encontramos nenhuma correspondência (BAELL e WALTERS, 2014). No entanto, essas ferramentas de previsão não substituem o teste experimental e, mais testes são necessários no futuro a respeito da segurança deste novo alcaloide, especificamente dados de genotoxicidade e toxicidade reprodutiva serão necessários.

O pKa é considerado como o valor de pH em que as concentrações entre as espécies ácida e básica são iguais. Os fármacos que tem propriedades básicas, quando estão em meio com elevado pH, tem predomínio na sua forma não-ionizada, ou seja, com baixa dissociação, o contrário é observado para os fármacos com características ácidas, pois estes em pH elevado tem predomínio na sua forma ionizada, com alto índice de dissociação (MARTINEZ & AMIDON, 2002; HONORIO, 2012). Consequentemente, os fármacos ácidos devem apresentar uma maior absorção na região do estômago, pois

prevalece a sua forma não ionizada, e os fármacos básicos devem apresentar uma maior absorção na região do intestino, pois também prevalece a sua forma não ionizada (ASHFORD, 2005a; BONAMICI, 2009; HONORIO, 2012). No ambiente intestinal, o valor de pH aumenta gradualmente até a região do íleo, apresentando uma variação de pH entre 4,9 e 7,4, em jejum, e pH entre 5,2 e 7,5 no estado alimentado. Na região do cólon, ocorre uma variação de pH entre 5,0 e 8,0, devido às bactérias existentes nessa região que metabolizam carboidratos e ácidos graxos. (ASHFORD, 2005b; AVDEEF, 2001; BONAMICI, 2009; GRBIC et al., 2011; HONORIO, 2012). Dessa forma, como a EPI em pH mais elevados aparentemente está presente na sua forma molecular, com pouca dissociação iônica, isso favorece sua absorção no intestino.

As análises termogravimétricas são de suma importância na área farmacêutica, pois auxiliam por exemplo, na avaliação da estabilidade dos fármacos e das formulações farmacêuticas, na pesquisa de polimorfos e em estudos de pureza. Muitos órgãos regulamentadores de insumos e produtos farmacêuticos já descrevem a importância da análise térmica e parâmetros de qualidade dela provenientes (De OLIVEIRA et al., 2011). No presente estudo, a análise termogravimétrica da EPI mostrou que a mesma não sofre degradação térmica até uma temperatura de cerca de 220°C, isso indica que a molécula pode ter um bom perfil de estabilidade a temperatura ambiente, sem risco de degradação. Além disso, a partir desta informação pode-se definir locais e temperaturas adequadas de acondicionamento para a EPI.

Os resultados dos ensaios *in vitro* com muitos fármacos não correspondem ao que se observa *in vivo*. Na verdade, o que funciona bem *in vitro* pode não funcionar *in vivo* e vice-versa, como mostrado por Katz et al., 2013 (KATZ et al., 2013). Nosso artigo mostra claramente que com *S. mansoni*, pode ocorrer diferenças consideráveis na eficácia de uma droga *in vitro* e *in vivo*. EPI não é muito potente *in vitro* quando comparado aos testes de PZQ também *in vitro*, isto é fato. Mas a resposta que observamos *in vivo* (40 mg/kg) foi melhor do que quando comparado ao grupo tratado com o medicamento de referência PZQ, de acordo com a literatura o número de animais utilizado neste estudo é apropriado para a experiência. Um aspecto prático importante a ser considerado é que EPI pode ser extraído e purificado a partir do resíduo de produção de pilocarpina a partir de folhas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), de modo que os custos totais de produção em comparação com outros ingredientes farmacêuticos ativos podem ser bem mais baixos.

## 4.5 Conclusões

Em conclusão EPI reduziu significativamente a carga parasitária dos vermes e o alcaloide não mostrou toxicidade mensurável no modelo testado, em concentrações superiores às concentrações eficazes do tratamento. Neste momento, EPI é um fármaco candidato promissor. São necessários mais estudos para avaliar a eficácia terapêutica de EPI, e para avaliar a eficácia deste fármaco contra diferentes estágios do ciclo de vida, bem como outras espécies de *Schistosoma*. No futuro, são necessários estudos farmacocinéticos para explorar o destino do fármaco no corpo. Além disso, o mecanismo de ação detalhado da EPI no *Schistosoma* continua a ser investigado com outros testes pré-clínicos.

## Agradecimentos

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Centro de Materiais da Universidade de Porto- -CEMUP. Os autores agradecem a um revisor anônimo pelos comentários que significativamente melhoraram o manuscrito.

## Referências

Ashford, M. Biodisponibilidade – fatores físico – químicos e relacionados à forma farmacêutica. In: Aulton, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.17, p. 245- 263, 2005a.

Ashford, M. O trato gastrointestinal – fisiologia e absorção de fármacos. In: Aulton, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. pp. 229-244.

Avdeef, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem.* 2000; 1: 301 – 212.

Baell J, Walters MA. Chemical con artists foil drug discovery. *Nature.* 2014; 513: 481–483.

Bonamici D. Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisemções. São Paulo, 2009. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

Botros S, Bennett J. Praziquantel resistance. *Expert Opin Drug Discov.* 2007; 2: 535–540.

Botros S, William S, Hammam O, Zídek Z. Holy A. Activity of 9-(S)-[3-Hydroxy-2-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine against *Schistosomiasis mansoni* in Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3853–3858.

Caffrey CR. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr Opin Chem Biol.* 2007; 11: 433–439.

Cioli D, Pica-Mattocchia L. Archer, S. Antischistosomal drugs: past, present... and future? *Pharmac Ther.* 1995; 68:35-85.

Clark G. Staining Procedures. Baltimore, London: Williams and Wilkins; 1981.

De Moraes J, De Oliveira RN, Costa JP, Junior ALG, de Sousa DP, et al. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease *Schistosomiasis Mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2617.

*Todos os direitos autorais reservados a Plos Neglected Tropical Diseases*

De Oliveira RN, Rehder VL, Oliveira AS, Jeraldo VdeL, Linhares AX, Allegretti SM. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol. 2014; 139:63-72.

Delgado VS, Suárez DP, Cesari IM, Hincam RN. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. *Parasitol Res*. 1992; 78: 648–654.

Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21: 659-667.

Eissa MM, El-Azzouni MZ, Amer EI, Baddour NM. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. *Int J Parasitol*. 2011; 41: 235–242.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51: 83–88.

Filho SB, Gargioni C, Pinto PLS, Chiodelli SG, Velloso SAG, Da Silva RM, Silveira MAB. Synthesis and evaluation of new oxamniquine derivatives. *Int J Pharm*. 2002; 233: 35–41.

Gans P, O'Sullivan B. GLEE, a new computer program for glass electrode calibration, *Talanta*. 2000; 51: 33-37.

Gans P, Sabatini A, Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta*. 1996 ; 43: 1739-1753.

Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Parasitol Res*. 1977; 52: 129–150.

Grbic S, Parojcic J, Ibric S, Djuric Z. In Vitro–In Vivo Correlation for Gliclazide Immediate-Release Tablets Based on Mechanistic Absorption Simulation. *AAPS PharmSciTech*. 2011; 12: 165- 171.



Grol E. Praziquantel. *Adv Pharmacol Chemother.* 1984; 20: 219-237.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006; 368: 1106–1118.

Hagan P, Appleton CC, Coles GC, KuseL JR, Tchuem-Tchuente LA. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. *Trends Parasitol.* 2004; 20: 92–97.

Hassanein H, Akl M, Shaker Z, el-Baz H, Sharmy R, et al. Induction of hepatic egg granuloma hyporesponsiveness in murine *Schistosomiasis mansoni* by intravenous injection of small doses of soluble egg antigen. *APMIS.* 1997; 105: 773–783.

Honorio, TS. Predição da biodisponibilidade e correlação *in vitro* – *in vivo* por simulação computacional de diferentes estudos de dissolução com efavirenz. Rio de Janeiro. 2012. 116 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med.* 2007; 357: 1018–1027.

Hou TJ, Xia K, Zhang W, Xu XJ. ADME Evaluation in Drug Discovery. 4. Prediction of Aqueous Solubility Base on Atom Contribution Approach. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004; 44: 266-275.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao L, Day TA, Bennett JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(6):932–935.

James SL, Colley DG. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni*. III. lymphokine involvement in the induction of eosinophil functional abnormalities. *Cell Immunol.* 1978; 38: 45–52.

Katz N, Chaves A, Pellegrino JP. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1972; 14: 397–400.

Katz N, Couto FFB, Araújo N. Imatinib activity on *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108: 850-853.

Keiser J, Chollet J, Xiao SH, Mei JY, Jiao PY, et al. Mefloquine – an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e350.

Kückelhaus SAS, Leite JRSA, Neves MP, Frota KS, Abdala LF, et al. Toxicity Evaluation to Mice of Phylloseptin-1, an Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Int J Pept Res Ther*. 2007; 13: 423-429.

Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arner ESJ, Williams DL. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLoS Med*. 2007; 206: 1071-86.

Lago EM, Xavier RP, Teixeira TR, Silva LM, Filho AAS, Moraes J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. *Fut Med Chem*. Published online 13 december 2017.

Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 141-51.

Magalhães LG, Machado CB, Morais ER, Moreira EB, Soares CS et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res*. 2009; 104: 1197-1201.

Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002; 79: 1–11.

Manneck T, Haggemüller Y, Keiser J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2010; 137: 85–98.

Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol*. 2002; 42: 620 – 643.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Prenkel JK. *In vitro* and *in vivo* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopy study. *Arzneimittelforschung*. 1981; 31: 544–554.

Miranda MA, Kuehn CC, Cardoso JF, Oliveira LG, Magalhães LG, et al. Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol*. 2013; 133: 396-402.

Mitsui Y, Miura M, Aoki Y. *In vitro* effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol*. 2009; 83: 7-11.

Moraes J. Antischistosomal natural compounds: Present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales AJ, Editors. *Current Topics in Tropical Medicine*. Rijeka, InTech; 2012. pp. 333–358.

Mostafa OM, Eid RA, Adly MA. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. *Parasitol Res*. 2011; 109: 395–403.

Olds GP, Mahmoud AAF. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis. Eosinophil-mediated destruction of eggs. *J Clin Investig*. 1980; 66: 1191–1199.

De Oliveira MA, Yoshida MI, Gomes ECL. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Quim. Nova*. 2011; 34: 1224-1230.

Olivier L, Stirewalt MA. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*. 1952; 38: 19–23.

Pellegrino J, Lima-Costa FF, Carlos MA, Mello RT. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*: XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative on mice, hamsters and cebus monkeys. *Parasitol Res*. 1977; 52: 151–168.

Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Am J Trop Med Hyg*. 1962; 11: 201–215.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1956; 8: 589–597.

Sander T, Freyss J, Von Korff M, Reich JR, Rufener C. OSIRIS, an Entirely in-House Developed Drug Discovery Informatics System. *J Chem Inf Model*. 2009; 49: 232-246.

Shaohong L, Kumagai T, Qinghua A, Xiaolan Y, Ohmae H, et al. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol Int*. 2006; 55: 63–68.

Silva VG, Silva RO, Damasceno SRB, Carvalho NS, Prudencio RS, et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. *J Nat Prod*. 2013; 76: 1071-1077.

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. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6: 411-425.

Szegezdi J, Csizmadia F. Method for calculating pKa values of small and large molecules. 2007. In: 233rd ACS (American Chemical Society) National Meeting, IL, Chicago.

Szegezdi J, Csizmadia F. Prediction of dissociation constant using microconstants. 2004. In: ACS (American Chemical Society) National Meeting. Anaheim, California.

Utzinger J, Keiser J, Shuhua X, Tanner M, Singer BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 1487–1495.

Utzinger J, Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother*. 2004; 5: 263–285.

Utzinger J, N’Goran EK, N’Dri A, Lengeler C, Xiao S, et al. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. *Lancet*. 2000; 355: 1320-1325.

Veras LM, Guimarães MA, Campelo YDM, Vieira MM, Nascimento C, et al. Activity of Epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Curr Med Chem*. 2012; 19: 2051-2058.

Véras LMC, Cunha VRR, Lima FCDA, Guimarães, MA, Vieira MM, et al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from

*Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. PLoS ONE. 2013; 8: e66702.

Voigtlander HW, Balsam G, Engelhardt M, Pohl L. Epiisopiloturin, ein neues *Pilocarpus*-Alkaloid. Arch Pharm. 1978; 311: 927–935.

Who. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical disease: a roadmap for implementation. 2012 Available: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/NTD\\_RoadMap\\_2012\\_Fullversion.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf) 12/05/14.

Xiao S, Shi Z, Zhuo S, Wang C, Zhang Z, et al. Field studies on the preventive effect of oral artemether against schistosomal infection. Chin Med J. 1996; 109: 272-275.



## Capítulo III

Atividade da episopilosina *in vivo* contra  
*Schistosoma mansoni*

## 5 Capítulo III – Atividade da episopilosina *in vivo* contra *Schistosoma mansoni*

Este capítulo relata os dados do artigo submetido na revista PLOS ONE (Qualis A1 em Biotecnologia).

### O alcaloide episopilosina tem atividade contra *Schistosoma mansoni* em camundongos sem apresentar toxicidade aguda

**Maria A. Guimarães**<sup>1,2,3</sup>, Rosimeire N. de Oliveira<sup>4</sup>, Rebeca Leite de Almeida<sup>1</sup>, Ana Carolina Mafud<sup>5,6</sup>, Ana Luiza Sarkis Vieira<sup>7</sup>, Rayane Ganassin<sup>8</sup>, Marcos P. N. da Silva<sup>9</sup>, Daniel B. Roquini<sup>9</sup>, Leiz Maria Costa Veras<sup>1</sup>, Tânia Cristina Higashi Sawada<sup>2</sup>, Cristina Dislich Ropke<sup>2</sup>, Luis Alexandre Muehlmann<sup>8,10</sup>, Graziella A. Joanitti<sup>8,10</sup>, Selma A. S. Kuckelhaus<sup>7</sup>, Silmara M. Allegretti<sup>4</sup>, Yvonne Primerano Mascarenhas<sup>5</sup>, Josué de Moraes<sup>9</sup>, José Roberto S. A. Leite<sup>3,7</sup>

Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil<sup>1</sup>;

Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA, Parnaíba, Piauí, Brasil<sup>2</sup>;

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil<sup>3</sup>;

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil<sup>4</sup>;

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil<sup>5</sup>;

Dept Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland<sup>6</sup>;

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UNB, Campus Dacy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brasil<sup>7</sup>;

Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, UNB, Campus Dacy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brasil<sup>8</sup>;

Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos, Guarulhos, São Paulo, Brasil<sup>9</sup>.

Faculdade de Ceilandia, Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Distrito Federal, Brasil<sup>10</sup>;

#Address correspondence to José Roberto S. A. Leite, [jrsaleite@gmail.com](mailto:jrsaleite@gmail.com); [jrleite@pq.cnpq.br](mailto:jrleite@pq.cnpq.br)

## Resumo

A esquistossomose é uma doença causada pelo gênero *Schistosoma*, e é considerada uma questão de saúde pública que atualmente afeta mais de 200 milhões de pessoas. O tratamento farmacológico é limitado ao uso de um único fármaco, o praziquantel, apesar dos relatórios de resistência. Devido a estas evidências, é perceptível a necessidade de investigar novos compostos esquistossomicidas. Neste estudo, foi testado a eficácia da epiisopilosina (EPIIS) em um modelo murino de esquistossomose, foi feita administração por via oral de uma dose única de 100 e 400 mg/kg de EPIIS em camundongos infectados com vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. O tratamento com a menor dose (100 mg/kg) mostrou uma diminuição significativa de 60,61% ( $P < 0,001$ ) da carga parasitária quando comparado ao grupo controle, diminuição da hepatoesplenomegalia e redução dos números de ovos imaturos. Uma análise de microscopia eletrônica de varredura também indicou mudanças morfológicas no tegumento de vermes após o tratamento. Além disso, o alcaloide não apresentou citotoxicidade *in vitro* (nas células HaCaT e NIH-3T3) na concentração de 512  $\mu\text{g/ml}$ , e as análises *in silico* de propriedades toxicológicas mostrou que EPIIS apresenta baixa previsão de toxicidade. Para confirmar isso, investigamos a toxicidade aguda sistêmica *in vivo* administrando oralmente uma dose de 2000 mg/kg em camundongos Swiss. Os camundongos (Swiss) tratados não apresentaram alterações significativas em parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos em comparação com animais não tratados. EPIIS mostra potencial como um fármaco esquistossomicida, pois não causa toxicidade aguda e mostra um perfil de segurança aceitável no modelo animal.

**Palavras-chaves:** Citotoxicidade; toxicidade aguda; células de mamíferos; alcaloides; atividade anti-helmintica; esquistossomose; *Pilocarpus microphyllus*.

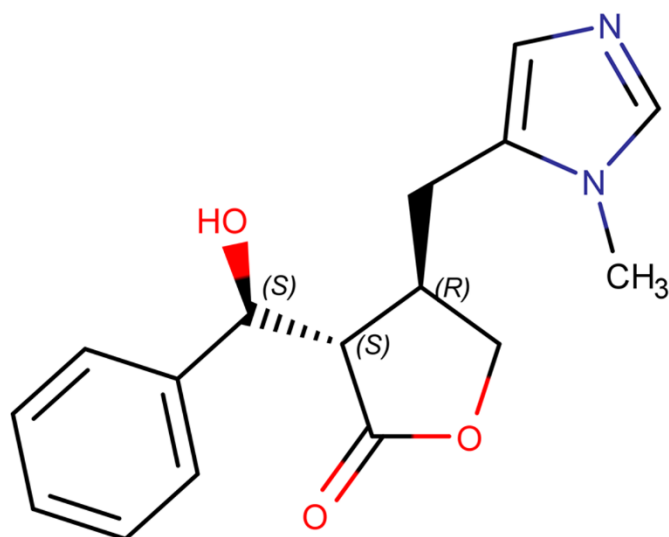


## 5.1 Introdução

A biodiversidade brasileira tem sido amplamente estudada e o aumento das pesquisas em relação as espécies de plantas e recursos naturais contribuiu para novas alternativas terapêuticas. Um exemplo desse desenvolvimento diz respeito à espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, popularmente conhecida como jaborandi, que é originária do Norte e Nordeste do Brasil (SKORUPA,2000; ROCHA et al., 2017). Atualmente, o alcaloide pilocarpina é produzido comercialmente por extração das folhas de jaborandi, pois este alcaloide é comercialmente utilizado para procedimentos oculares cirúrgicos e tratamento de glaucoma e, portanto, é de grande interesse econômico (AVANCINI et al., 2003; ROCHA et al., 2017). As folhas de jaborandi, como outras espécies de plantas, contêm vários metabolitos bioativos cujas propriedades farmacológicas e fisiológicas não foram totalmente elucidadas ou ainda estão sendo estudadas, também contém epiisopiloturine (EPI), um alcaloide com propriedades anti-esquistosoma (BENTO et al., 2010; LUCIO et al., 2000; VERAS et al., 2012; GUIMARAES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015).

EPIIS, (3R, 4S) -3 - [(S) -hidroxi (fenil) metil] -4 - [(3-metil-3H-1 $\lambda$ <sup>2</sup>-imidazolidin-4-il) metil] oxolan-2-ona é um isômero da EPI como mostrado na Figura 12, e tem-se relatado que a mesma atua como um estimulante periférico do sistema nervoso parassimpático (LUCIO et al., 2000). Poucos estudos se concentraram nas atividades biológicas de EPIIS, porém, sua atividade *in vitro* contra *S. mansoni* já foi observada anteriormente (ROCHA et al., 2017), assim como sua atividade *in vitro* contra formas promastigotas e amastigota de *Leishmania chagasi* (ALBUQUERQUE 2010). Esses resultados evidenciaram a necessidade de realizar estudos *in vivo* da EPIIS para desenvolver novas formulações e rotas de administração desse alcaloide, principalmente em relação ao seu possível uso contra a esquistossomose. Além disso, é importante avaliar a possível toxicidade, uma vez que os estudos de toxicidade aguda em animais são utilizados para cumprir requisitos relacionados ao controle de riscos para a saúde humana e o meio ambiente (OECD 2002; ARCANJO et al., 2016).

**FIGURA 12:** Estrutura química do alcaloide EPIIS, com heteroátomos e estereoisômeros anotados.



No presente estudo, a atividade *in vivo* de EPIIS contra vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada. Os efeitos sobre a oviposição e a redução da hepatoesplenomegalia também foram avaliados, bem como os efeitos deste alcaloide sobre a morfologia do tegumento dos parasitas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, avaliamos a citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares e a toxicidade aguda *in silico* e *in vivo* de EPIIS.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Purificação do alcaloide

O alcaloide EPIIS foi purificado a partir da biomassa gerada pela produção de sais de pilocarpina. O processo de obtenção de biomassa foi descrito por Veras et al. 2013 e o isolamento de EPIIS foi realizado de acordo com os métodos descritos por Rocha et al. 2017.

### 5.2.2 *Parasitas e hospedeiros intermediários e definitivos*

Para manter o ciclo de vida de *S. mansoni*, utilizamos *Biomphalaria glabrata* como hospedeiro intermediário e camundongos Balb/C fêmeas como hospedeiro definitivo. O estudo foi realizado no Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp, onde todos os animais foram mantidos sob temperatura e umidade controladas (25°C e 70%, respectivamente). Os camundongos foram previamente infectados por exposição a uma suspensão contendo aproximadamente 70 cercárias de acordo com Olivier e Stirewalt (1952).

### 5.2.3 *Tratamento in vivo contra vermes S. mansoni adultos*

No primeiro passo, os animais foram divididos em dois grupos (n=8) e tratados 60 dias após a infecção. Os animais do Grupo I foram tratados por via oral com uma dose única de 400 mg/kg de EPIIS, e os animais do grupo II (controle) receberam, por via oral, 0,3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). No segundo passo, os animais foram divididos em dois grupos (n=8) e tratados 60 dias após a infecção. Os animais do Grupo III foram tratados por via oral com uma dose única de 100 mg/kg de EPIIS, e os animais do grupo IV (controle) receberam, por via oral, 0,3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os grupos a EPIIS foi solubilizada com PBS.

Os camundongos foram eutanasiados 15 dias após o tratamento. Os vermes *S. mansoni* foram recuperados através da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas de acordo com o método descrito por Pellegrino e Siqueira et al., 1956. Para quantificar a carga de vermes e ovos, a porcentagem de redução de vermes foi calculada de acordo com o método descrito por Delgado et al. 1992. A contagem dos ovos eliminados nas fezes (OPG) foi realizada pelo método quantitativo de Kato-Katz (Katz et al., 1972). As porcentagens dos diferentes estádios de desenvolvimento (ovos imaturos, maduros e mortos, via oograma) foram calculadas a partir da parede intestinal dos camundongos infectados de acordo com o método descrito por Hermeto et al. 1994.

### 5.2.4 *Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)*

Para a análise de microscopia, um novo grupo de animais foi tratado separadamente seguindo o esquema de tratamento relatado acima, mas com a diferença de que os camundongos foram eutanasiados 48 h após o tratamento e os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperadas através da perfusão do sistema porta-hepático. Os vermes foram lavados com tampão de cacodilato de sódio (0,1 M), fixados em 2,5% de

glutaraldeído (pH 7,4, Merck®) durante 24 h, e depois fixados em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 h. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) por 30 min cada, secas em um secador de ponto crítico, montadas em talões, metalizadas com partículas de ouro usando um revestidor de pulverização e, finalmente, analisadas e fotografadas usando um microscópio eletrônico (Jeol-JSM-820).

#### 5.2.5 *Análises in silico e propriedades toxicológicas*

A estrutura molecular da EPIIS foi desenhada na versão MarvinSketch 17.4.3, e as propriedades toxicológicas *in silico* foram calculadas e determinadas usando o software pkCSM (PIRES et al., 2015).

#### 5.2.6 *Cultura de células e ensaios de citotoxicidade in vivo*

As células de fibroblastos murinos (NIH-3T3) e queratinócitos humanos (HaCaT) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução antibiótica. As células foram mantidas em uma incubadora sob atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Para a análise de células em tempo real (RTCA, xCelligenceRoche, Suíça), as células NIH-3T3 e HaCaT foram semeadas em placas de cultura contendo biossensores eletrônicos. Após 24 h de cultura, as células foram tratadas com EPIIS ou sem o fármaco (controle). As concentrações de EPIIS foram de 32 e 512 µg/mL (equivalente a 111,8 and 1790,2 µM), respectivamente, e as taxas de células aderidas foram medidas a cada 30 min durante 137 h.

### 5.2.7 Avaliação da Toxicidade Aguda

A avaliação toxicológica *in vivo* de EPIIS foi realizada utilizando o Teste de Classe de Toxicidade Aguda (OECD 2002), um protocolo reconhecido internacionalmente por várias agências reguladoras e recomendado pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), guia número 423 (OECD, 2002). Os camundongos Swiss fêmeas foram divididos em três grupos com três animais cada: um grupo controle tratado com uma solução de 5% de DMSO em solução salina e um grupo tratado com EPIIS. O fármaco foi solubilizado com a dose mais alta recomendada (2000 mg/kg de peso corporal) em uma solução de 5% de DMSO em solução salina. Esta dose foi fracionada em três administrações durante o dia, em intervalos inferiores a 24 h. O volume máximo de 0,1 mL/10 g de peso foi administrado. Os animais foram então monitorados nas primeiras 8 h para observar possíveis mortes e após 24 h o tempo de observação para cada grupo foi em torno de 30 minutos a 1 h. Os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados de acordo com o Guia da OCDE para reconhecimento, avaliação e uso de sinais clínicos, que consta na série de Publicações da OCDE em saúde e segurança ambiental em testes e avaliação no. 19 (OECD 2002).

### 5.2.8 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Após o 14º dia de observação, os animais foram eutanasiados por asfixia em uma câmara de CO<sub>2</sub> e foram colhidas amostras de sangue dos animais através do plexo orbitário com a ajuda de um tubo capilar de vidro e tubos de coleta com ativador de coagulação e géil separador. O sangue foi condicionado em dois tipos de tubos: um com anticoagulante de hemoglobina (Laborlab®) para determinar parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obter soro para avaliação de parâmetros bioquímicos. Para análises bioquímicas, o material foi centrifugado a 1200 x g durante 5 minutos antes de determinar a glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, HDL, LDL, fosfatase alcalina, proteína total, e níveis de albumina e de globulina. Os valores para hemácias, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de hematologia Advia 120/hematologia (Siemens). As contagens de leucócitos diferenciais foram realizadas em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (MALONE et al., 1977; AL-HABORI et al., 2002).

### 5.2.9 *Análise histopatológica*

Imediatamente após a eutanásia, foram coletados fragmentos de fígado, baço, rim, cérebro, pulmão, estômago, intestino delgado e intestino grosso dos animais e fixados em 10% de formaldeído tamponado. É importante notar que isso inclui o corte de várias regiões dos órgãos. Após a fixação, os órgãos foram desidratados em diluições em série de álcool etílico durante 1 h em cada diluição, diafanizados em xileno durante 30 min e embebidos em parafina durante 5 min. As seções destes órgãos de 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas sob microscópio de luz (VIEIRA et al., 2013).

### 5.2.10 *Análise estatística*

Os testes estatísticos foram realizados através do software Graphpad Prism (versão 5.0). O teste de Dunnet foi utilizado para analisar a significância estatística das diferenças entre valores experimentais médios e controles. Para o ensaio de RTCA foi analisado os valores de média e desvio padrão. O nível de significância foi definido em  $P < 0,05$ .

### 5.2.11 *Protocolo ético*

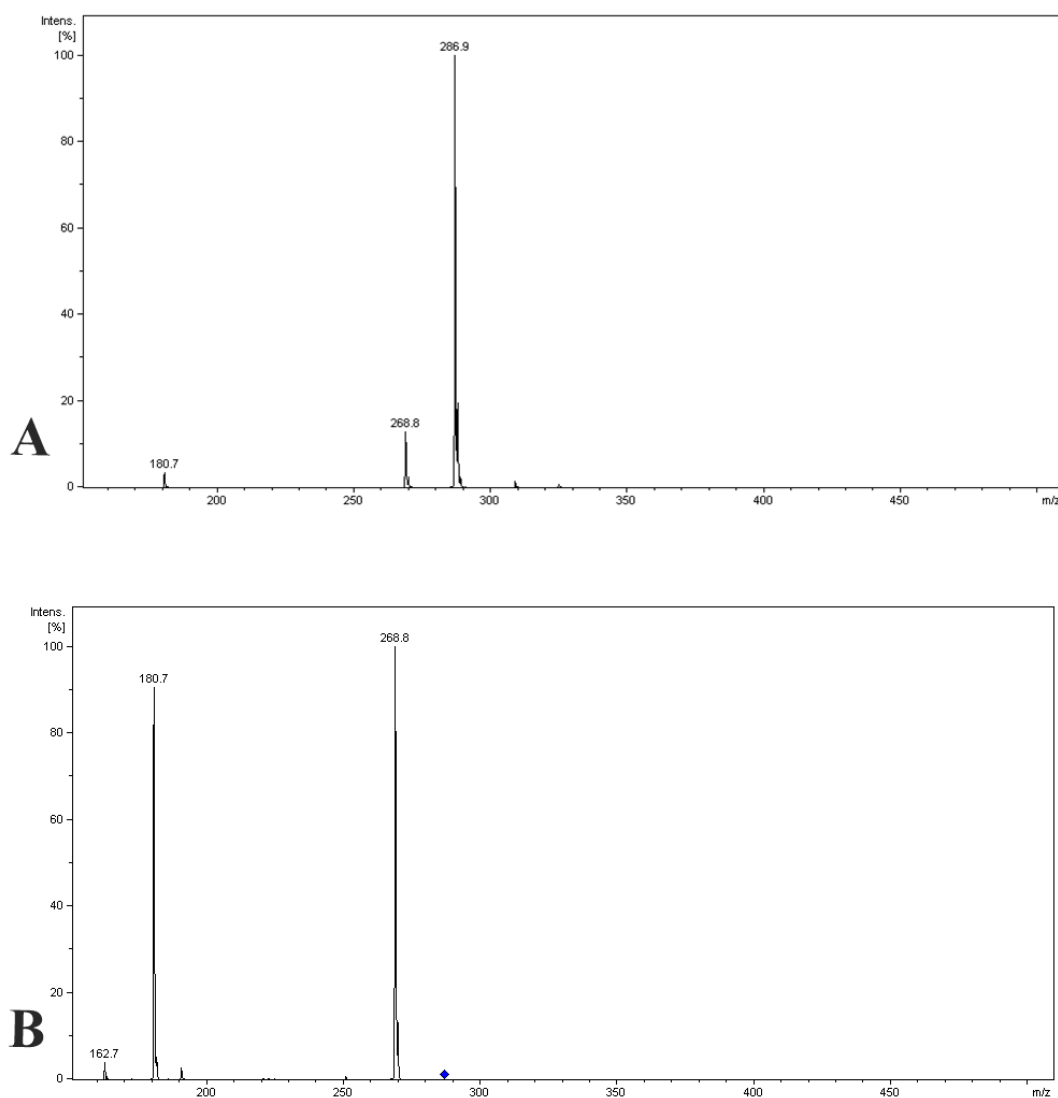
Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA / UNICAMP, protocolo nº 2170-1) e estavam de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela CEUA.

## 5.3 **Resultados**

### 5.3.1 *Purificação da EPIIS*

A análise de espectrometria de massas prova que os métodos de separação utilizados foram bem-sucedidos. A análise MS / MS mostrou um íon pseudomolecular com  $m/z$  286,9 Da  $[M + H]^+$  e um fragmento  $MS^2$  com  $m/z$  268,8 Da  $[M - H_2O + H]^+$  e 180,7 Da (figura 13A e 13B), este “molecular fingerprint” é característico da EPIIS conforme demonstrado anteriormente por Veras (2014) e Rocha et al. (2017).

**FIGURA 13:** Espectro de massa de EPIIS. (A) Íon pseudomolecular com m/z 286,9 Da  $[M + H]^+$ . (B) fragmentos  $MS^2$  com m/z 268,8 Da  $[M - H_2O + H]^+$  e 180,7 Da.

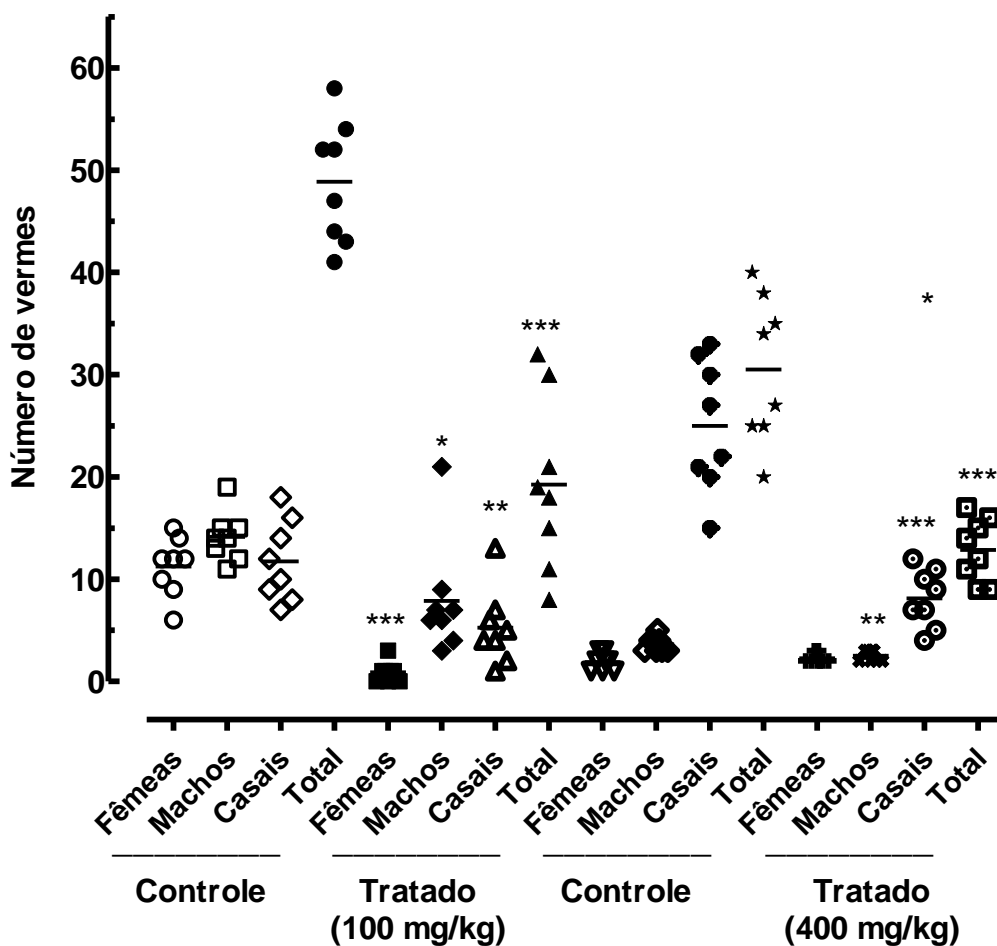


### 5.3.2 EPIIS mostrou atividade contra formas adultas de *S. mansoni* em camundongos infectados

Em camundongos infectados com *S. mansoni*, houve redução na carga parasitária após o tratamento oral com EPIIS, como mostrado na Figura 14. As análises mostraram que a dose única de 400 mg/kg causou uma redução da carga parasitária total de 57,78% ( $P < 0,001$ ). A dose de 100 mg/kg de EPIIS reduziu a carga parasitária total dos camundongos para 60,61% ( $P < 0,001$ ) comparado ao controle não infectado. A carga

parasitária total, das fêmeas e dos machos depois do tratamento com EPIIS é mostrado na figura 14.

**FIGURA 14:** Efeito na carga parasitária com administração de 100 mg/kg e 400 mg/kg de EPIIS em dose única, por via oral. EPIIS foi administrada em camundongos que estavam infectados com *S. mansoni* e duas semanas após o tratamento os animais foram eutanasiados. Os pontos representam dados de camundongos individuais infectados e tratados com EPIIS, ou infectados e não tratados (controle). As barras horizontais representam valores médios. \* P <0,05, \*P<0,01 e \*\*\* P <0,001 em comparação com o grupo não tratados.





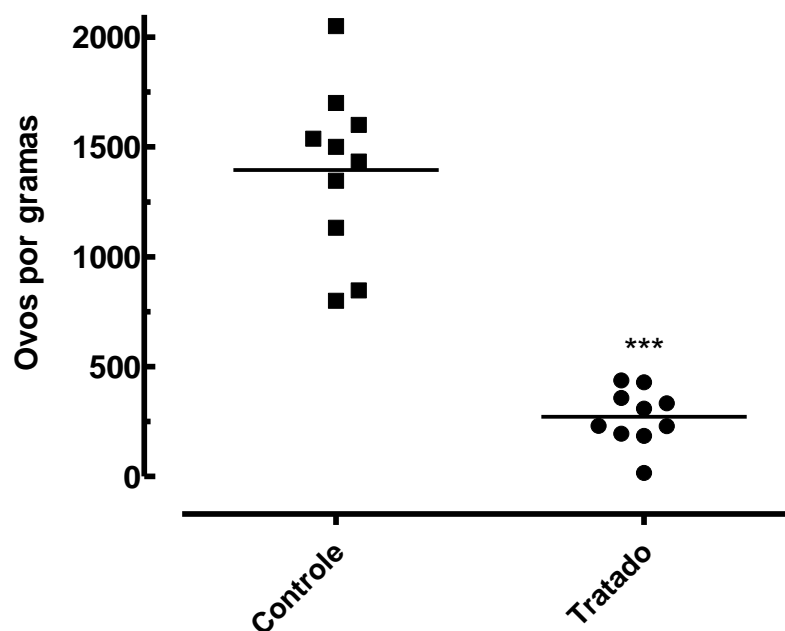
Como a dose única de 400 mg/kg não mostrou diferença na carga de vermes em comparação com a dose de 100 mg/kg, mostraremos os resultados para a produção de ovos, peso do fígado e baço e a investigação de microscopia eletrônica de varredura somente para a menor dose investigada (100 mg/kg).

### 5.3.3 *EPIIS diminui o desenvolvimento dos ovos, bem como os pesos do fígado e do baço.*

Os efeitos da EPIIS nos estágios de desenvolvimento dos ovos (padrão de oograma) aos 60 dias após a infecção são mostrados na Tabela 6. A administração de uma dose única de 100 mg/kg causou uma redução no número de ovos imaturos para 45,84%. O oograma também mostrou um aumento significativo na porcentagem de ovos mortos em camundongos tratados (19,16%) em comparação com o grupo controle (2,25%).

Nas amostras de fezes coletadas de camundongos, o método de Kato-Katz revelou que a EPIIS reduziu significativamente o número de ovos em comparação com o grupo controle não tratado, com uma redução de 58% ( $P < 0,001$ ) na dose de 100 mg/kg (Figura 15). Além disso, o tratamento oral com EPIIS diminuiu significativamente a esplenomegalia e hepatomegalia, com  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente (Figura 16).

**FIGURA 15:** Efeito na carga total de ovos com uma dose única de 100 mg/kg de EPIIS administrado a camundongos estavam infectados com *S. mansoni*. Os pontos representam dados de camundongos individuais infectados e tratados com EPIIS, ou infectados e não tratados (controle). As barras horizontais representam valores médios. \*\*\* P < 0,001 em comparação com o grupo não tratados.

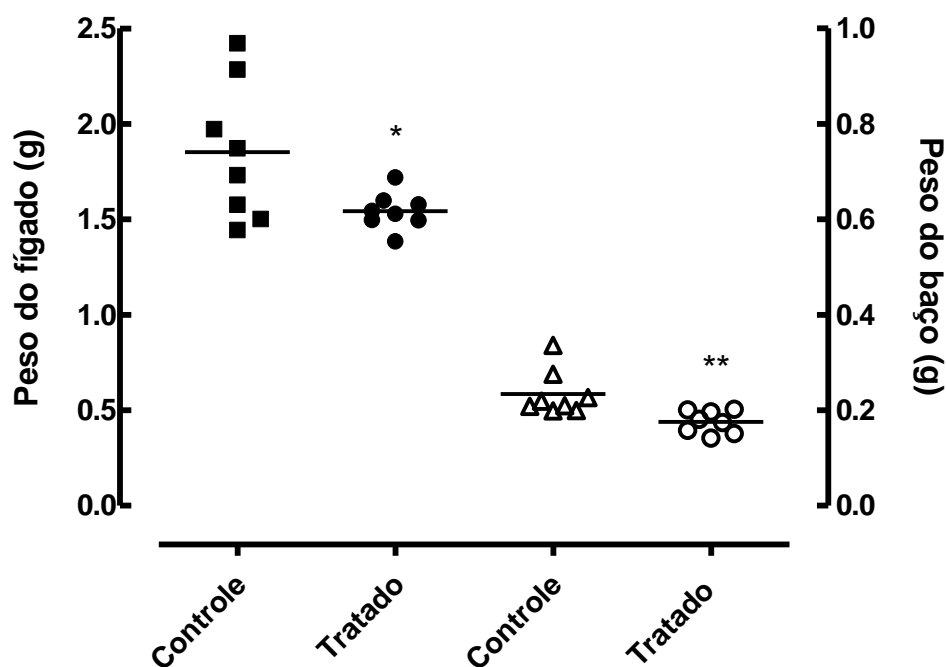


**Tabela 6.** Efeito na oviposição, 15 dias após o tratamento com EPIIS (60 dias após a infecção).

Amostra	Dose (mg/kg)	Porcentagem dos ovos em cada estágio de desenvolvimento		
		Imaturos	Maduros	Mortos
Controle	PBS	78,14%	19,59%	2,25%
EPIIS	100 mg/kg	45,84%**	34,98%	19,16%**

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  SEM. Número de animais / grupo = 8. Os asteriscos indicam que as diferenças em relação ao controle foram significativas com \*\* P < 0.01.

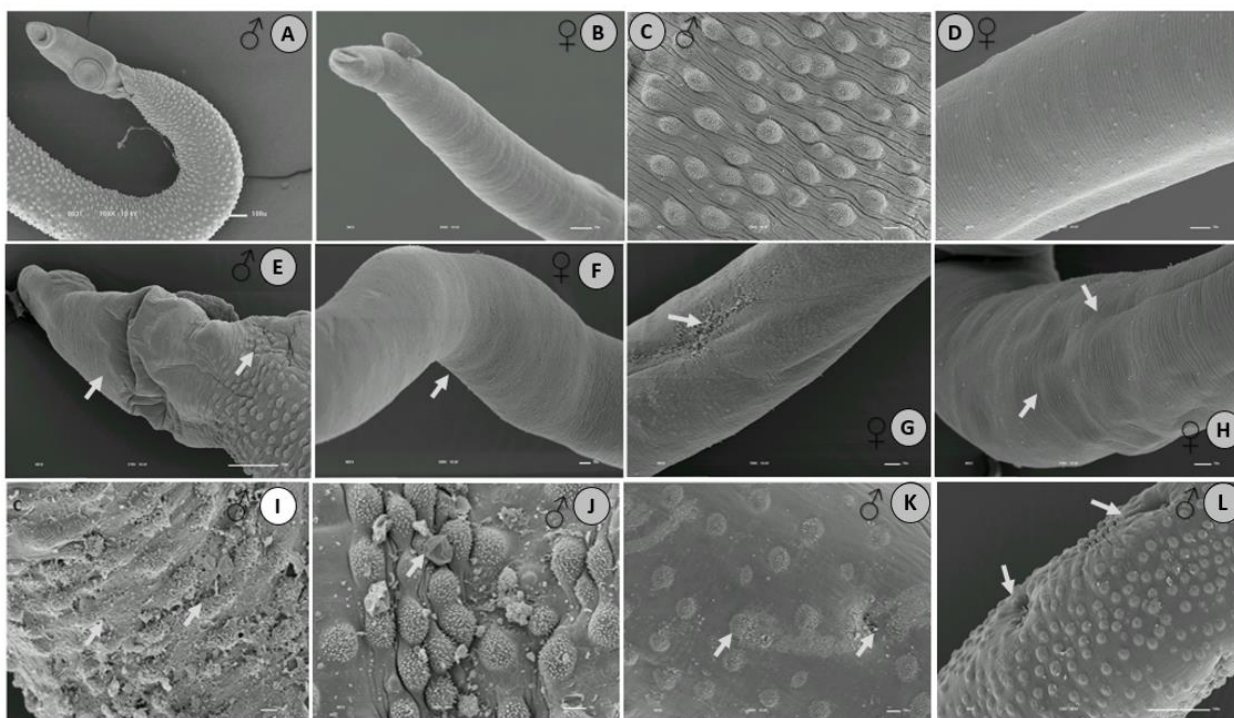
**FIGURA 16:** Efeito do tratamento com EPIIS sobre o peso relativo do fígado e do baço. Os pontos representam dados de camundongos individuais infectados e tratados com EPIIS, ou infectados e não tratados (controle). As barras horizontais representam valores médios. \*\* P <0,01 e \* P <0,05 em comparação com os grupos não tratado.



#### 5.3.4 EPIIS causou mudanças na morfologia do tegumento de *S. mansoni*

A morfologia da superfície do tegumento de *S. mansoni* após o tratamento com 100 mg/kg de EPIIS foi analisada por MEV. No grupo controle (não tratado), a ventosa oral e ventral, tubérculos e espinhas dos vermes machos e fêmeas apresentaram integridade normal (Figuras 17A-D). O tratamento com EPIIS causou mudanças no tegumento de machos e fêmeas (Figuras 17E-L), mas o dano tegumental foi particularmente evidente em vermes do sexo masculino. Os vermes machos examinados mostraram descamação extensa de tubérculos, falta de coluna vertebral e formação de protuberâncias na região dorsal (Figuras 17I-L).

**FIGURA 17:** Microscopia eletrônica de varredura de adultos de *S. mansoni* recuperados 48 h depois do tratamento com EPIIS (100 mg/kg). A-D: grupo controle - não tratado (A e C são vermes machos, B e D são vermes fêmeas); E-L: verme macho e fêmea tratados com 100 mg/kg de EPIIS. E, I, J e L são vermes machos; F, G, H e K são vermes fêmeas. As setas mostram danos no tegumento com redução do tamanho das espinhas e danos nas ventosas orais e ventrais em vermes machos, seguido de ondulação corporal em vermes fêmeas. Escala de barras de imagem: (A) 100X\_\_10 kv; (B) 120X \_\_10 kv; (C-D) 180X \_\_10 kv; (E-F) 127X \_\_10 kv; (G-H) 250X\_\_10 kv; (I- L) 350X\_\_10 kv.



### 5.3.5 EPIIS têm previsão *in silico* de baixa toxicidade

A análise *in silico* das propriedades toxicológicas de EPIIS mostrou que a dose máxima tolerada humana é de 0,451 log mg/kg/ dia. Os únicos parâmetros que mostraram a toxicidade prevista foram o inibidor II do gene humano-é-a-go-go humano (hERG) e a hepatotoxicidade. Para hERG I e sensibilização da pele, o estudo *in silico* para EPIIS não mostrou toxicidade. (Tabela 7).

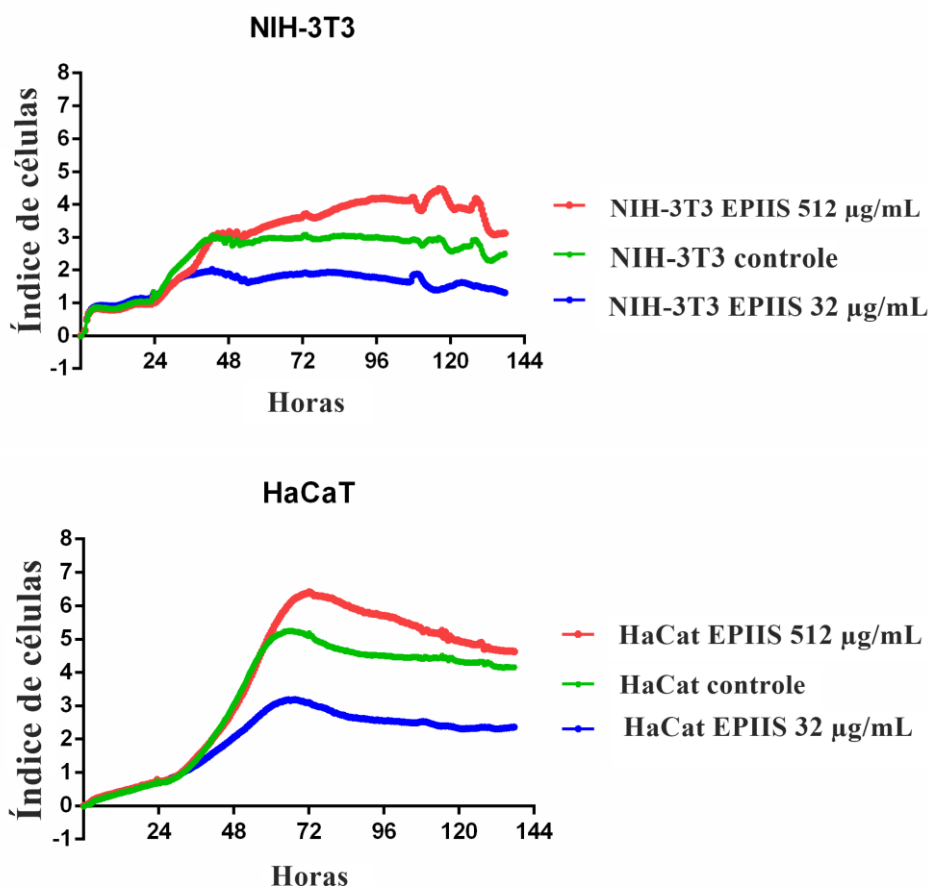
**Tabela 7.** Análise *in silico* das propriedades toxicológicas de EPIIS usando a metodologia pkCSM.

<b>Nome do modelo</b>	<b>Unidade</b>	<b>Preferido</b>	<b>EPIIS</b>
Dose máx. tolerada (humanos)	log mg/kg/day	<0.477	0.451
Inibidor de hERG I	-	Não	Não
Inibidor de hERG II	-	Não	Sim
Hepatotoxicidade	-	Não	Sim
Sensibilização da pele	-	Não	Não

### 5.3.6 Efeito da EPIIS na viabilidade celular

A citotoxicidade de EPIIS foi avaliada pela análise de índice de células em tempo real (RTCA) com duas linhagens celulares normais: fibroblastos murinos (NIH-3T3) e queratinócitos humanos (HaCaT). A RTCA mostrou que os índices de adesão nas células NIH-3T3 e HaCaT foram diminuídos por EPIIS a uma concentração de 32 µg/mL. No entanto, não houve diminuição significativa nos índices de adesão celular em comparação com os grupos controle quando EPIIS foi utilizado em 512 µg/mL (Figura 18).

**FIGURA 18:** Índices de adesão de NIH-3T3 e células de HaCaT. As concentrações de EPIIS foram de 32 ou 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As taxas de células aderidas foram medidas a cada 30 min durante 137 h.



### 5.3.7 EPIIS não mostrou sinais clínicos visíveis de toxicidade aguda em camundongos

No teste de toxicidade aguda em camundongos, não foram observados sinais clinicamente visíveis de toxicidade (cianose, piloereção, contorção, ptose da pálpebra, tremores, convulsões, ataxia ou diarreia) após administração oral de 2000 mg/kg de EPIIS e todos os camundongos sobreviveram ao período de examinação de 14 dias. Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controle para os parâmetros de atividade motora, taxa respiratória e reflexos córneos e auriculares. Assim, como a DL50 da EPIIS foi superior a 2000 mg/kg, a molécula é classificada na categoria 5 de toxicidade aguda de acordo com a classificação do protocolo da OECD nº 423.

### 5.3.8 EPIIS não causou alterações bioquímicas ou hematológicas em camundongos

Os valores obtidos a partir da avaliação de parâmetros bioquímicos são mostrados na Tabela 8. No grupo tratado com EPIIS, apenas o colesterol total e a lipoproteína de alta densidade (HDL) mostraram um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle.

**Tabela 8.** Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos Swiss fêmeas tratados com EPIIS por via oral.

Parâmetros	Controle	EPIIS
ALT (UI/L)	83,3 ± 10,5	122 ± 25,6
AST (UI/L)	111,0 ± 13,60	96,2 ± 11,60
Glicose (mg/dL)	164,0 ± 2,14	150,0 ± 7,07
Ureia (mg/dL)	83,3 ± 7,25	89,2 ± 6,49
Creatinina (mg/dL)	0,167 ± 0,04	0,317 ± 0,07
Colesterol total (mg/dL)	91,7 ± 2,32	138,0 ± 16,90*
HDL (mg/dL)	27,3 ± 2,95	55,2 ± 4,71***
LDL (mg/dL)	72,7 ± 8,33	61,7 ± 21,20
Fosfatase alcalina (UI/L)	85,0 ± 15,50	103,0 ± 8,17
Proteínas totais(g/dL)	5,23 ± 0,05	6,55 ± 0,74
Albumina (g/dL)	1,96 ± 0,06	2,16 ± 0,14
Globulina (g/dL)	3,27 ± 0,26	4,39 ± 0,62

Valores representam as médias ± SEM. Número de animais/grupo = 6. Os asteriscos indicam que diferenças em relação ao controle foram significativas com \*\*\*P < 0.001 and \*P < 0.05. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; HDL: lipoproteína de alta-densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

A análise dos parâmetros hematológicos é mais precisa na predição dos efeitos tóxicos das drogas em seres humanos quando os dados são extrapolados de estudos em animais (CARILO et al., 2014; LI et al., 2015). Os parâmetros hematológicos dos

camundongos tratados com EPIIS não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Tabela 9).

**Tabela 9.** Parâmetros hematológicos obtidos do soro de camundongos Swiss fêmeas tratados com EPIIS por via oral.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>EPIIS</b>
Hemácias (x 10 /uL)	9,34 ± 0,028	9,84 ± 0,287
Hemoglobina (g/dL)	13,9 ± 0,148	14,6 ± 0,410
Volume globular (%)	43,0 ± 0,365	44,8 ± 1,490
VCM (fL)	45,8 ± 0,121	45,6 ± 0,711
CHCM (%)	32,3 ± 0,347	32,5 ± 0,634
Contagem total de leucócitos (/uL)	10,0 ± 0,479	10,8 ± 0,856
Linfócitos (/uL)	8,90 ± 0,443	7,90 ± 1,600
Eosinófilos (/uL)	0,124 ± 0,039	0,024 ± 0,024
Monócitos (/uL)	0,100 ± 0,005	0,101 ± 0,054
Plaquetas (mil/uL)	1030,0 ± 50,900	944,0 ± 72,600

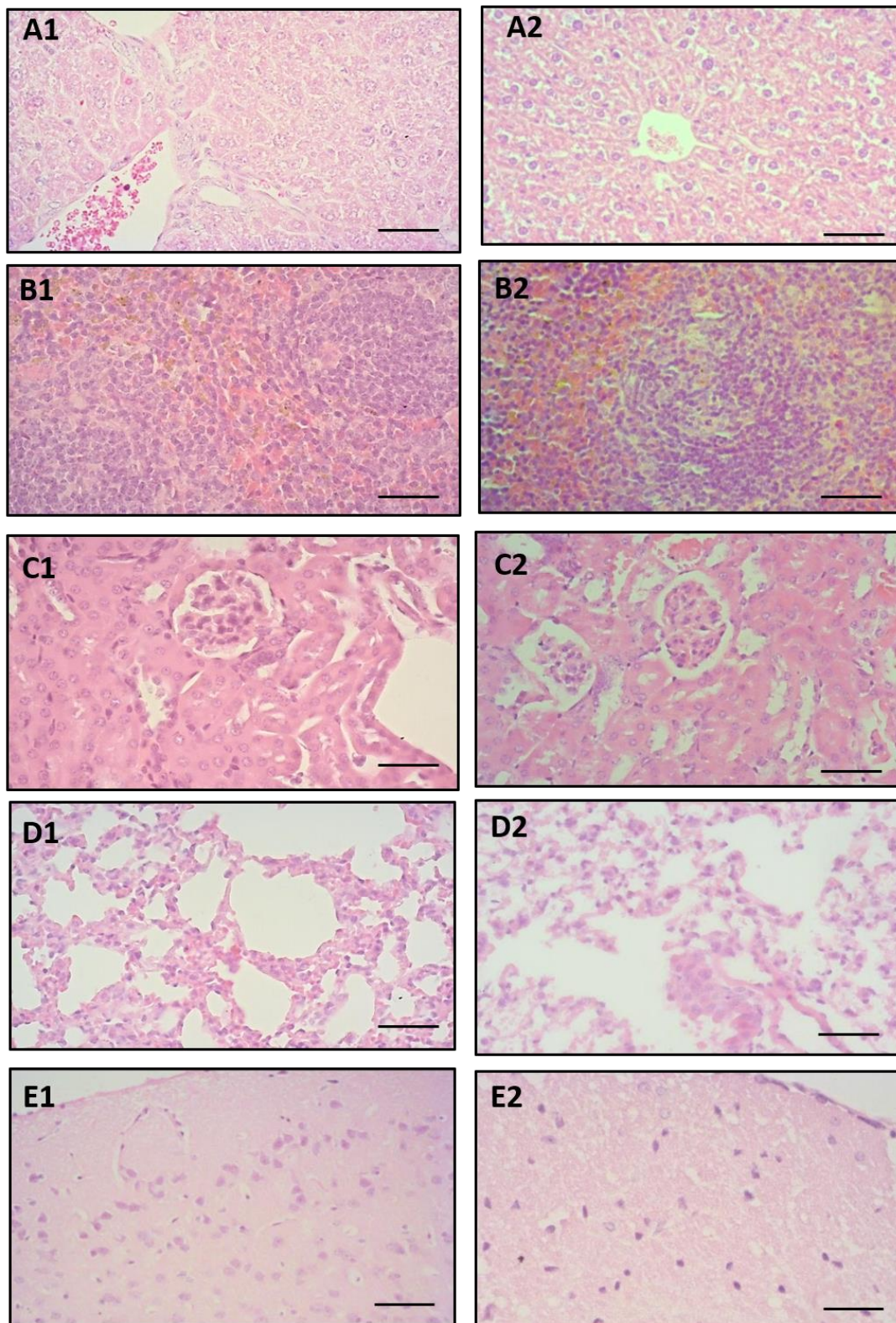
Valores representam as médias ± SEM. Número de animais/grupo = 6. Os asteriscos indicam que diferenças em relação ao controle foram significativas com \*P < 0.05. VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média.

### 5.3.9 EPIIS não causou alterações histopatológicas

Um estudo detalhado das seções representativas do fígado, baço, rim, pulmão, cérebro, estômago, intestino delgado e intestino grosso de camundongos Swiss tratados com doses orais de 2.000 mg/kg de EPIIS não revelou alterações morfológicas quando comparadas às seções histológicas obtidas do grupo controle. Não foram encontradas alterações patogênicas características de toxicidade. Fotomicrografias de seções histológicas do fígado, baço, rim, pulmão e cérebro são mostradas na Figura 20.



**FIGURA 19:** Fotomicrografias de fígado (A1, A2), baço (B1, B2), rim (C1, C2), pulmão (D1, D2) e cérebro (E1, E2), obtidos de animais dos grupos controle não tratado (primeira coluna) e tratados com 2000 mg/kg de EPIIS (segunda coluna). Coloração Hematoxilina & Eosina, aumento 400x. barra = 50  $\mu$ m.



## 5.4 Discussão

Os resultados encontrados provam que a purificação de EPIIS foi bem-sucedida, uma vez que os fragmentos encontrados na análise de espectrometria de massas estão em uma estrutura molecular de acordo com o que foi descrito por Veras (2014) e Rocha et al. (2017).

O estudo experimental usando um modelo com camundongos para esquistossomose mostra que a EPIIS afetou a sobrevivência de *S. mansoni*, a motilidade e a produção de ovos, além de induzir alterações tegumentares nas ventosas orais e ventrais dos parasitas. O tegumento de *S. mansoni* é bem reconhecido como um importante alvo de drogas e modelo de estudo para esquistossomose (MORAES, 2012), além de ter um efeito direto sobre a sobrevivência, alterações tegumentares podem resultar na exposição dos antígenos parasitários ao sistema imune do hospedeiro (DOENHOFF et al., 1987). Segundo Xiao et al., 2000, o dano nas ventosas deve resultar em uma perda de capacidade de aderir aos vasos sanguíneos, dificultando a ingestão de nutrientes do sangue. Outros autores observaram alterações tegumentares semelhantes após avaliar diferentes compostos *in vivo*, por exemplo, EPI e Phytol (GUIMARAES et al., 2015; DE MORAES et al., 2014). A EPIIS tem estimulação semelhante à pilocarpina no sistema nervoso parassimpático periférico (LUCIO et al., 2000). Assim como foi relatada anteriormente que a pilocarpina não exerce efeito colinérgico no sistema neuromuscular de vermes *Schistosoma* (DAY et al., 1996) pode ser que a EPIIS também não exerça essa ação sobre o verme. Os mecanismos que levam a morte do parasita pela EPIIS podem estar associados a títulos elevados de anticorpos séricos contra antígenos tegumentares. Anticorpos séricos de camundongos podem estar ligados à membrana superficial de vermes adultos expostos a EPIIS, como foi demonstrado para o ácido araquidônico (EL RIDI et al., 2012).

Nossos resultados também mostraram uma diminuição significativa na carga de ovos total (número de ovos por gramas de fezes) e na porcentagem de ovos imaturos no tecido intestinal de animais tratados com EPIIS, bem como aumento na porcentagem de ovos maduros. Portanto, EPIIS pode afetar a fecundidade dos vermes, especialmente os vermes femininos, diminuindo assim a capacidade de depositar ovos. A ação direta ovicida também pode ser levada em consideração, devido ao aumento do número de ovos mortos (DE MORAES et al., 2014; SILVA et al., 2017).

Os resultados aqui apresentados revelaram que o tratamento com 100 mg/kg de EPIIS causou uma redução na carga total de vermes. Na literatura, porém, percebemos que a maioria dos compostos testados contra *S. mansoni* mostrou atividade em concentrações superiores a 100 mg/kg, por exemplo, dihidroartemisinina (LI et al., 2012), artemeter (EL-BESHBISHI et al., 2013) e nerolidol (SILVA et al., 2017) enquanto que (-) - 6,6'- dinitrohinokinina reduziu a carga total de vermes a uma concentração de 100 mg/kg (PEREIRA et al., 2015), mas em menor extensão que a EPIIS neste estudo. Além disso, o tratamento apresentou maior redução nos vermes femininos, o que é importante, pois as fêmeas são responsáveis pela oviposição e produzem cerca de 300 ovos por dia, todos eles viáveis, metabolicamente ativos e altamente antigênicos (HAMS et al., 2013). A maior atividade da EPIIS em fêmeas de *S. mansoni* coincide com os resultados de estudos anteriores *in vivo* que investigam produtos naturais esquistossomicidas ou compostos derivados de produtos naturais, como a dihidroartemisinina (LI et al., 2012; MOSTAFA et al., 2011; LESCANO et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2014). Portanto, especulamos que a EPIIS pode atuar em diferentes alvos em machos e fêmeas, mas o mecanismo de ação ainda precisa ser esclarecido.

Além da avaliação terapêutica de EPIIS contra *S. mansoni*, também foi realizado testes de citotoxicidade *in vitro*. Esses ensaios são essenciais nos estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos, pois fornecem uma estimativa da dose inicial e do intervalo de concentrações a serem utilizados nos estágios não clínicos *in vivo* (ARCANJO et al., 2016; OECD, 2010). Nossos resultados estão de acordo com os achados relatados para outros alcaloides imidazóis que não demonstraram forte atividade tóxica em células de mamíferos (toxicidade aguda e citotoxicidade) (KOWALSKA-PYLKA et al., 2001). Curiosamente, entre todas as concentrações de EPIIS testadas em células de fibroblastos, 32 µg/mL foi a única concentração que induziu redução na viabilidade celular. Sabe-se que moléculas pouco solúveis em água tendem a formar agregados e/ou precipitados dependendo de diferentes fatores, como propriedades físicoquímicas, concentração, pH, sal e força iônica (FRENKEL et al., 2005; SAVIANI et al., 2012). Este fenômeno pode ser exemplificado com ftalocianinas (fotossensibilizadores hidrófobos utilizados para aplicações médicas) onde o aumento de sua concentração em meio aquoso leva a formação agregada que prejudica sua eficácia (TSUBONE et al., 2014). Sugerimos que o EPIIS, que também é uma molécula hidrofóbica, possui um comportamento dependente da dose semelhante nos ensaios *in*

*vitro*, uma vez que uma citotoxicidade significativa foi observada com um tratamento com EPIIS de 32 µg/mL, enquanto não se mostrou citotoxicidade com a dose de 512 µg/mL (dose 16x maior). A análise detalhada do comportamento de EPIIS em solução deve ser considerada em outros estudos.

Alguns azóis, como o cetoconazol, exibem alta toxicidade para os rins e o fígado, ligando-se a enzimas P450 de mamíferos, incluindo P4503A4 e várias hidroxilases de esteróides (BILLAUD et al., 2009). Assim, devido à toxicidade conhecida de alguns alcaloides, realizamos um estudo de predição de toxicidade e um estudo de toxicidade aguda de camundongos tratados com EPIIS.

A análise *in silico* revelou que a EPIIS possui a dose máxima tolerada humana com valor dentro da especificação preferida. A previsão do pkCSM da inibição hERG considera os valores de IC50 de cerca de 360 compostos (para análises de HERG I) e parâmetros moleculares de mais de 800 compostos (para análise de HERG II) (ARCANJO et al., 2016; MARCHESE et al., 2011; WANG et al., 2012). Em nosso estudo, apenas o modelo hERG II mostrou resultados positivos, mas não o modelo hERG I. Esses dados apontam um possível efeito cardiotoxíco de EPIIS, mas como foram aplicados conjuntos de dados diferentes no mesmo modelo, os resultados de predição podem certamente mostrar alguma variabilidade, como mostrado para o Peptídeo BPP-BrachyNH2 (ARCANJO et al., 2016). São necessários mais estudos para conhecer a ação parasimpatomimética desta molécula no coração de vertebrados e músculos lisos vasculares. Além disso, embora o estudo *in silico* tenha predito hepatotoxicidade para EPIIS, não foi observada alteração nos parâmetros bioquímicos séricos *in vivo*, como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bem como na análise histopatológica do fígado.

Com relação à toxicidade aguda, EPIIS foi considerada segura, com DL50 acima de 2000 mg/kg. Qualquer droga ou composto com uma DL50 oral superior a 1000 mg/kg é considerado seguro e de baixa toxicidade (ADENEYE et al., 2009; KIFAYATULLAH et al., 2015). Além disso, todos os parâmetros hematológicos para os camundongos nos grupos tratados com EPIIS não mostraram diferença significativa quando comparado ao grupo controle, indicando que o alcaloide testado pode não ter efeitos nocivos sobre a função da medula óssea ou induzir anemia. Não observamos alterações marcantes nos parâmetros bioquímicos séricos de animais tratados quando comparados aos dos animais controle. No entanto, são necessários mais estudos para entender o efeito de EPIIS sobre

o aumento dos níveis de colesterol e HDL, embora este aumento na lipoproteína possa ser benéfico nos casos de colesterolemia. Além disso, o aumento do colesterol total pode ter ocorrido somente devido ao efeito EPIIS na fração HDL.

Corroborando com os resultados bioquímicos obtidos para este estudo, não houve alterações histopatológicas significativas ou diferenças morfológicas nos órgãos analisados (fígado, baço, rins, cérebro, pulmões, coração, estômago, intestino delgado e intestino grosso) para camundongos no grupo controle e aqueles tratados com EPIIS.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que a ação principal de EPIIS é carga parasitária de vermes fêmeas. Além disso, os tratamentos causaram redução significativa da carga de ovos e alterações morfológicas nos parasitas, parâmetros parasitológicos essenciais para a descoberta de drogas para esquistossomose. O alcaloide não mostrou citotoxicidade *in vitro* na concentração de 512 µg/mL, nem toxicidade *in vivo* após administração de dose única no modelo avaliado. Assim, a ausência de toxicidade observada para este alcaloide demonstra um perfil de segurança aceitável para estudos em modelos animais com o objetivo de investigar os potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos para esta molécula em relação à sua atividade contra a esquistossomose.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Phytobios, empresa do Grupo Centroflora, pelo seu apoio durante a realização desta pesquisa. Esta pesquisa recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (MCTI /CNPq/MS-SCTIE DECIT N. 404134 /2012-2). Ana Carolina Mafud agradece a FAPESP (Grants 2014 / 02282-76 e 2016 / 18023-5). Josué de Moraes agradece a FAPESP (Grant 2016 / 22488-3).

## Referências

- Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol.* 2002; 83: 209–17.
- Arcanjo DDR, Mafud AC, Vasconcelos AG, Silva-Filho JC, Amaral MPM, Brito LM, et al. In silico, in vitro and in vivo toxicological assessment of bpp-brachynh2, a vasoactive proline-rich oligopeptide from *Brachycephalus ephippium*. *Int J Pept Res Ther.* 2016; 23: 323-331.
- Avancini G, Abreu IN, Saldaña MDA, Mohamed RS, Mazzafera P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry.* 2003; 63: 171–175.
- Bento RRF, Silva LE, Faria JLB, Freire PTC, De Oliveira MCF, Romero NR, et al. Comparative vibrational spectra of pilosine and epiisopilosine crystals. *Braz J Phys.* 2010; 40: 217–223.
- Billaud EM, Antoine C, Berge M, Abboud I, Lefeuvre S, Benammar M, Glotz D. Management of metabolic cytochrome P450 3A4 drug-drug interaction between everolimus and azole antifungals in a renal transplant patient. *Clin Drug Investiq.* 2009; 29: 481–486.
- Botros S, William S, Hammam O, Zi'dek Z, Holy' A. Activity of 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine against *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3853–3858.
- Carrillo JC, Adenuga MD, Mckee RH. The sub-chronic toxicity of regular white spirit in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014; 70: 222–230.

Day TA, Chen GZ, Miller C, Tian M, Bennett JL, Pax RA. Cholinergic inhibition of muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Digenea). *Parasitology*. 1996; 113: 55-61.

De Moraes J, De Oliveira RN, Costa JP, Junior ALG, de Sousa DP, Freitas RM, et al. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. 8: e2617.

De Moraes J. Natural Products with antischistosomal activity. *Future Med Chem*. 2015; 7: 801-820.

Delgado VS, Suárez DP, Cesari IM, Hincam RN. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. *Parasitol Res*. 1992; 78: 648–654.

Doenhoff MJ, Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 81: 947–951.

El Ridi R, Tallima H, Salah M, Aboueldahab M, Fahmy OM, Al-Halbosiy MF, Mahmoud SS. Efficacy and mechanism of action of arachidonic acid in the treatment of hamsters infected with *Schistosoma mansoni* or *Schistosoma haematobium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39:232-9.

Frenkel YV, Clark AD Jr, Das K, Wang YH, Lewi PJ, Janssen PA, Arnold E. Concentration and pH Dependent Aggregation of Hydrophobic Drug Molecules and Relevance to Oral Bioavailability. *J Med Chem*. 2005; 48: 1974-1983.

Guimaraes MA, Campelo YDM, Vêras LMC, Lima DF, Ciancaglini P, Kuckelhaus SS, et al. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in

liposome system: preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14: 4519–4528.

Guimarães MA, de Oliveira RN, Vêras LMC, Lima DF, Campelo YDM, Campos AS, et al. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003656.

Hams E, Aviello G, Fallon PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol.* 2013; 4: 89.

Hermeto MV, Bicalho RS, Da Silva RE, De Melo AL, Pereira LH. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. *Rev Inst Med Tropical São Paulo.* 1994; 36: 99–103.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Tropical São Paulo.* 1972; 14:397-400.

Kowalska-Pylka AH, Mayer-Dziedzic B, Niewiadomy A, Matysiak J. Evaluation of substituted benzthioanilides toxicity using *in vitro* tests. *Altern Lab Anim.* 2001; 29: 547–556.

Li F, He X, Niu W, Feng Y, Bian J, Xiao H. Acute and sub-chronic toxicity study of the ethanol extract from leaves of *Aralia elata* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175: 499–508.

Li HJ, Wang W, Qu GL, Li YZ, Tao YH, Xing YT et al. Effect of the *in vivo* activity of dihydroartemisinin against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Parasitol Res.* 2012; 110: 1727–1732.



Lucio EMRA, Rosalen PL, Sharapin, N, Souza Brito, ARM. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revi bras Farmacogn* 2000; 9/10: 23–35.

Malone MH. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Wagner H, Wolf P, editors. *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin: Springer Verlag, 1977. pp. 23-53.

Marchese Robinson RL, Glen RC, Mitchell JBO. Development and comparison of hERG blocker classifiers: assessment on different datasets yields markedly different results. *Mol Inform*. 2011; 30: 443–458.

Moraes J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales AJ, editors. *Current topics in tropical medicine*. Croatia: Rijeka, InTech; 2012. pp. 333–358.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 16;65: 55–63.

OECD. Guidance document on acute oral toxicity testing. In: *OECD series on testing and assessment*. OECD Publishing, Paris; 2002.

OECD. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. In: *OECD Series on Testing and Assessment*. Paris: OECD Publishing; 2002. p. 39.

OECD. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. In: *OECD series on testing and assessment*. OECD Publishing, Paris; 2010. pp. 1–54.

OECD. Test no. 423: acute oral toxicity—acute toxic class method. Paris: OECD Publishing; 2002.

Olivier L, Stirewalt MA. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol. 1952; 38: 19–23.

Pellegrino, J., Siqueira, A.F., 1956. Infusion technique for collecting *Schistosoma mansoni* in experimentally infected guinea pigs. Rev Bras Malariol 8, 589– 597.

Pereira AC, E Silva MLA, Souza JM, De Laurentiz RS, Rodrigues V, Januário AH, et al. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of (-)-6,6'-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 2015; 149: 195–201.

Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. J Med Chem. 2015; 14;58: 4066-4072.

Rocha JA, Andrade IM, Vêras LMC, Quelemes PV, Lima DF, Soares MJS, et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. Phytother Res. 2017; 31: 624–630.

Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. ISRN Pharmaceutics. 2012; 2012:10 pages.

Silva MP, De Oliveira RN, Mengarda AC, Roquini DB, Allegretti SM, Salvadori MC, et al. Antiparasitic activity of Nerolidol in a mouse model of Schistosomiasis. Int J Antimicrob Agents. 2017; 50: 467-472.

Skorupa LA. Espécies de *Pilocarpus vahl* (RUTACEAE) da Amazônia Brasileira. Acta Amaz. 2000; 30: 59–70.

Tsubone TM, Braga G, Vilsinski BH, Gerola AP, Hioka N, Tessaro AL, Caetano w. Aggregation of Aluminum Phthalocyanine Hydroxide in Water/Ethanol Mixtures. J Braz Chem Soc. 2014; 25: 890-897.

Veras,LM. Caracterização e Aplicações Biotecnológicas de Alcaloides Isolados do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Tese de doutorado. Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí-UFPI. 2014.

Veras LM, Guimarães MA, Campelo YD, Vieira MM, Nascimento C, Lima D, et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. Curr. Med Chem. 2012; 19: 2051–2058.

Veras LMC, Cunha VRR, Lima FCDA, Guimarães MA, Vieira MM, Campelo YDM, et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against schistosomiasis. PLoS One. 2013; 8: e66702.

Vieira ALS, Silva TMA, Mol JPS, Oliveira SC, Santos RL. MyD88 and TLR9 are required for early control of *Brucella ovis* infection in mice. Res Vet Sci. 2013; 94: 399–405.

Wang S, Li Y, Wang J, Chen L, Zhang L, Yu H, Hou T. ADMET evaluation in drug discovery. 12. Development of binary classification models for prediction of hERG potassium channel blockage. Mol Pharm. 2012; 9: 996–1010.

Xiao H, Shen BG, Chollet J, Tanner M. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. Acta Trop. 2000; 75: 341–348.

## 6 Considerações Finais e Perspectivas

A partir de todos os resultados obtidos foi possível concluir que:

- O alcaloide epiisopiloturina quando administrado por via oral em camundongos BALB/c apresentou atividade *in vivo* contra *S. mansoni* na concentração de 40 mg/kg
- O alcaloide epiisopilosina quando administrado por via oral em camundongos Balb/C apresentou atividade *in vivo* contra *S. mansoni* na concentração de 100 mg/kg.
- Suspeita-se que a epiisopiloturina pode ter agido como um fármaco anti-inflamatório na redução dos granulomas no fígado e na hepatoesplenomegalia dos camundongos.
- As alterações morfológicas observadas no tegumento de *S. mansoni* pode ser um mecanismo pelo qual a epiisopiloturina e a epiisopilosina levam à morte do *S. mansoni*.
- O acoplamento da epiisopiloturina com a enzima tioredoxina-glutationa redutase (TGR), mostrou que este alcaloide não se liga a enzima e provavelmente este não é o alvo.
- Os resultados de pKa mostraram que a epiisopiloturina em pH mais elevados aparentemente está presente na sua forma molecular, com pouca dissociação iônica, isso favorece sua absorção no intestino.
- O alcaloide epiisopilosina não apresenta efeitos citotóxicos para as células 4T1, B16F10, HaCaT e NIH-3T3.

- A avaliação toxicológica aguda *in vivo* da epiisopiloturina após administração por via oral, mostrou uma DL<sub>50</sub> de 8000 mg/kg e foi observado que os camundongos têm uma alta resistência aos efeitos tóxicos deste alcaloide.
- A avaliação toxicológica aguda *in vivo* da epiisopilosina após administração por via oral, mostrou uma DL<sub>50</sub> superior a 2000 mg/kg e não apresentou sinais de toxicidade em camundongos Swiss, indicando um perfil de segurança para realização de testes *in vivo*.

A partir dos resultados apresentados nesta Tese de Doutorado com os alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina apresentamos as seguintes perspectivas:

- Realização de estudos farmacocinéticos para explorar o destino dos fármacos no corpo.
- Realização de estudo toxicológico sub-crônico (28 dias) *in vivo*, com avaliação de sinais comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos em ratos ou camundongos tratados diariamente com epiisopiloturina e epiisopilosina.
- Realização de estudos para avaliar o mecanismo de ação da epiisopiloturina e epiisopilosina contra o parasita *S. mansoni*.
- Avaliar a eficácia destes dois fármacos contra diferentes estágios do ciclo de vida, bem como outras espécies de *Schistosoma*.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da epiisopilosina e verificar se esta ação pode ter relação com a diminuição da hepatoesplenomegalia durante a esquistossomose.

## 7 Outras atividades desenvolvidas

Durante o período de realização do curso de Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO, outras atividades acadêmico-científicas foram realizadas, como a publicação de 01 (um) artigo científico e submissão de mais 2 (dois) artigos científicos em periódicos internacionais indexados relacionado com o referido Projeto de Tese (vide apêndice). Além disso, o envolvimento em outras atividades de pesquisas no grupo e em parcerias originaram outras 3 (três) publicações e uma submissão em periódicos internacionais (vide apêndice), além de outras produções listadas a seguir:

### 7.1 Artigos publicados em periódicos relacionados ao referido projeto

1. **GUIMARÃES, M.A.**; DE OLIVEIRA, R.N.; VÉRAS, L.M.C.; LIMA, D.F.; CAMPELO, Y.D.M.; CAMPOS, S.A. et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. PLoS Neglected Tropical Disease; 2015; 9(3): e0003656.

### 7.2 Artigos publicados em parcerias

1. QUELEMES, PATRICK V.; PERFEITO, MÁRCIA L.G.; **GUIMARÃES, MARIA A.**; DOS SANTOS, RAIMUNDA C.; LIMA, DAVID F.; NASCIMENTO, CARLOS; SILVA, MARCOS P.N.; SOARES, MARIA JOSÉ DOS S.; ROPKE, CRISTINA D.; EATON, PETER; DE MORAES, JOSUÉ; LEITE, JOSÉ ROBERTO S.A. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. Journal of Ethnopharmacology, v.175, p.287 - 294, 2015.
2. DIAS, SÁVIA FRANCISCA LOPES; NOGUEIRA, SILVANIA SIQUEIRA; DOURADO, FLAVIANE DE FRANÇA; **GUIMARÃES, MARIA ADELAIDE**; PITOMBEIRA, NÁDIA ALINE DE OLIVEIRA; GOBBO, GRACIELY GOMIDES; PRIMO, FERNANDO LUCAS; PAULA, REGINA CÉLIA MONTEIRO DE; FEITOSA, JUDITH PESSOA ANDRADE; TEDESCO, ANTONIO CLAUDIO; NUNES, LÍVIO CESAR. CUNHA; LEITE, JOSÉ ROBERTO SOUZA ALMEIDA; DA SILVA, DURCILENE ALVES. Acetylated Cashew Gum-based Nanoparticles for Transdermal Delivery of Diclofenac Diethyl Amine. Carbohydrate Polymers, v. 143, p. 254-261, 2016.

3. CAMPELO, Y.D.M.; MAFUD, A.C.M.; VÉRAS, L.M.C.; **GUIMARÃES, M.A.**; YAMAGUCHI, L.F.; LIMA, D.F.; ARCANJO, D.D.R.; KATO, M.J.; MENDONÇA, R.Z.; PINTO, P.L.S.; MASCARENHAS, Y.P.; SILVA, M.P.N.; DE MORAES, J.; EATON, P.; LEITE, J.R.S.A. Synergistic effects of in vitro combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88 (2017) 488–499.

### 7.3 Trabalhos apresentados em eventos

1. FARIAS, J. P.; ARAUJO, A. R.; OLIVEIRA, A. C. J.; **GUIMARÃES, MARIA A.**; NOBRE, M. L. M.; VERAS, P. Q.; LEITE, J.R.S.A . Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas oriundas do Piauí sobre espécies de *Candida* sp.. In: I Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, 2015, Parnaíba-PI. Resumos, 2015.
2. FARIAS, J. P.; **GUIMARÃES, M. A.**; ARAUJO-NOBRE, A. R. M.; NOBRE, M. L. M.; LEITE, J.R.S.A . Estudo do potencial antibacteriano de extratos de plantas típicas do Piauí contra estirpes de *Staphylococcus aureus*. In: X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. V Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, 2015, Juazeiro-BA. Resumos, 2015.
3. FARIAS, J. P.; **GUIMARÃES, M. A.**; ARAUJO, A. R.; NOBRE, M. L. M.; **LEITE, J.R.S.A.** Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas oriundas do Piauí sobre espécies de *Candida* sp.. In: III Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste. Encontro Luso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Parnaíba-PI. Resumos, 2016.
4. AGUIAR, A. M. C.; NOLÊTO, R. P.; GONÇALVEZ, B. P.; **GUIMARÃES, M. A.**; VERAS, L. M. C.; DABOIT, T. C. Susceptibilidade de isolados fúngicos frente à epiisopiloturina, um alcaloide imidazólico. In: Congresso Internacional de Estudantes e Profissionais da Saúde - Delta Saúde, 2017, Luís Correia-PI. Resumos, 2017.


**APÊNDICE A** – Artigo publicado no periódico internacional Plos Neglected Tropical Diseases.



## RESEARCH ARTICLE

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

Maria A. Guimarães<sup>1</sup>, Rosimeire N. de Oliveira<sup>2</sup>, Leiz M. C. Vêras<sup>1,3</sup>, David F. Lima<sup>1,3,4</sup>, Yuri D. M. Campelo<sup>1,3</sup>, Stefano Augusto Campos<sup>1</sup>, Selma A. S. Kuckelhaus<sup>5</sup>, Pedro L. S. Pinto<sup>6</sup>, Peter Eaton<sup>7</sup>, Ana C. Mafud<sup>8</sup>, Yvonne P. Mascarenhas<sup>8</sup>, Silmara M. Allegretti<sup>2</sup>, Josué de Moraes<sup>9</sup>, Aleksandar Lolić<sup>10</sup>, Tatjana Verbić<sup>10</sup>, José Roberto S. A. Leite<sup>1\*</sup>



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Guimarães MA, de Oliveira RN, Vêras LMC, Lima DF, Campelo YDM, Campos SA, et al. (2015) Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 9(3): e0003656. doi:10.1371/journal.pntd.0003656

**Editor:** Timothy G. Geary, McGill University, CANADA

**Received:** October 16, 2014

**Accepted:** February 27, 2015

**Published:** March 27, 2015

**Copyright:** © 2015 Guimarães et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazilian Ministry of Education (CAPES, Grant 705/2009, Nanobiomed Network), the authors ACM, YM, JRSAL, MAG, and LMCV. This work has also been supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (grants number PEst-CE/QLA0006/2011 and PTDC/CTM-NAN/109877/2009) (The author PE) and through a joint Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

**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 São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil, **9** Research Center for Neglected Diseases (NPDN/FACIG), Guarulhos, São Paulo, Brazil, **10** Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

\* [jrsaleite@gmail.com](mailto:jrsaleite@gmail.com); [jrleite@cnpq.pq](mailto:jrleite@cnpq.pq)

## Abstract

Schistosomiasis is a serious disease currently estimated to affect more than 207 million people worldwide. Due to the intensive use of praziquantel, there is increasing concern about the development of drug-resistant strains. Therefore, it is necessary to search for and investigate new potential schistosomicidal compounds. This work reports the in vivo effect of the alkaloid epiisopiloturine (EPI) against adults and juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. EPI was first purified its thermal behavior and theoretical solubility parameters characterized. In the experiment, mice were treated with EPI over the 21 days post-infection with the doses of 40 and 200 mg/kg, and 45 days post-infection with single doses of 40, 100 and 300 mg/kg. The treatment with EPI at 40 mg/kg was more effective in adult worms when compared with doses of 100 and 300 mg/kg. The treatment with 40 mg/kg in adult worms reduced parasite burden significantly, lead to reduction in hepatosplenomegaly, reduced the egg burden in faeces, and decreased granuloma diameter. Scanning electron microscopy revealed morphological changes to the parasite tegument after treatment, including the loss of important features. Additionally, the in vivo treatment against juvenile with 40 mg/kg showed a reduction of the total worm burden of 50.2%. Histopathological studies were performed on liver, spleen, lung, kidney and brain and EPI was shown to have a DL50 of 8000 mg/kg. Therefore EPI shows potential to be used in schistosomiasis treatment. This is the first time that schistosomicidal in vivo activity of EPI has been reported.

**APÊNDICE B** – Comprovante de submissão do artigo intitulado “The alkaloid epiisopilosine has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without cytotoxicity or acute toxicity”.

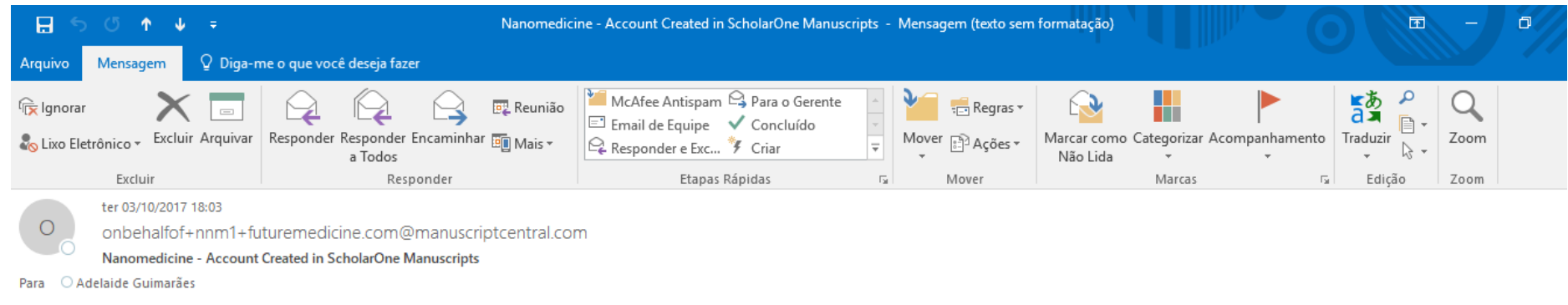
## PLOS ONE

The episopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without cytotoxicity or acute toxicity

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-17-41483
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	The episopilosine alkaloid has activity against <i>Schistosoma mansoni</i> in mice without cytotoxicity or acute toxicity
<b>Short Title:</b>	Epiisopilosine for schistosomiasis without toxicity
<b>Corresponding Author:</b>	José Roberto de Souza de Almeida Leite, Ph.D. Universidade de Brasília Brasília, BRAZIL
<b>Keywords:</b>	Cytotoxicity; acute toxicity; alkaloid; anthelmintic activity; schistosomiasis; <i>Pilocarpus microphyllus</i> .
<b>Abstract:</b>	Schistosomiasis, a disease caused by the <i>Schistosoma</i> genus, is considered a public health issue that currently affects more than 200 million people. Pharmacological treatment is limited to the use of a single drug, praziquantel, despite reports of resistance and low efficacy. It is therefore necessary to investigate new potential schistosomicidal compounds. In this study, the efficacy of episopilosine was tested in a murine model of schistosomiasis. Administration of a single 100 mg/kg oral dose of episopilosine to mice harboring an adult <i>Schistosoma mansoni</i> infection resulted in a decrease in worm burden to 60.61% of its starting number, decreased hepatosplenomegaly, and a reduction in immature egg numbers. A scanning electron microscopy analysis also indicated morphological changes in the worm tegument after treatment. In addition, we performed cytotoxicity and toxicological studies with episopilosine and the alkaloid showed no in vitro cytotoxicity (in 4T1, B16F10, HaCaT, and NIH-3T3 cells), also in silico analysis of toxicological properties showed that episopilosine have low toxicity predictions. To confirm this, we investigated systemic acute toxicity in vivo by orally administering a 2000 mg/kg dose to Swiss mice. Treated mice showed no significant changes in hematological, biochemical, and histological parameters in comparison to non-treated animals. Episopilosine shows potential as a schistosomicidal drug, as it does not cause acute toxicity and displays an acceptable safety profile in the animal model.
<b>Order of Authors:</b>	Maria Adelaide Guimarães Rosimeire Nunes de Oliveira Rebeca Leite de Almeida Ana Carolina Mafud Ana Luiza Vieira Sarkis Rayane Ganassin Leiz Maria Costa Veras Tânia Cristina Higashi Sawada Cristina Dislich Ropke Luis Alexandre Muehlmann Selma Aparecida Souza Kuckelhaus Silmara Marques Allegretti Yvonne Primerano Mascarenhas Josué de Moraes José Roberto de Souza de Almeida Leite, Ph.D.

**APÊNDICE C** – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Self-nanoemulsifying drug delivery systems improve oral absorption and antischistosomal activity of epiisopiloturine” realizado em colaboração com a Universidade de Brasília-UNB.



03-Oct-2017

Dear Dr. Guimarães:

A manuscript titled SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS IMPROVE ORAL ABSORPTION AND ANTISCHISTOSOMAL ACTIVITY OF EPIISOPILOTURINE (NNM-2017-0308) has been submitted by Dr. Luiza de Lima to Nanomedicine.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-nnm>

USER ID: [aguimaraes@phytobios.com.br](mailto:aguimaraes@phytobios.com.br)

PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

[https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-nnm?URL\\_MASK=589335df097f4ed08c2954e153028185](https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-nnm?URL_MASK=589335df097f4ed08c2954e153028185)

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/fm-nnm> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Kind regards,  
Nanomedicine Editorial Office

**APÊNDICE D** – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Antinociceptive and anti-inflammatory activities of imidazole alkaloids from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*: role of cyclooxygenase” realizado em colaboração com a Universidade Federal do Ceará.

Your co-authored submission - Mensagem (HTML)

Arquivo Mensagem Diga-me o que você deseja fazer

Ignorar Excluir Arquivar Responder Responder a Todos Encaminhar Reunião Mais

McAfee Antispam Para o Gerente  
Email de Equipe Concluído  
Responder e Exc... Criar

Mover Regras Ações

Marcar como Não Lida Categorizar Acompanhamento

Traduzir Edição Zoom

seg 18/12/2017 17:03  
Journal of Ethnopharmacology <EvisSupport@elsevier.com>  
Your co-authored submission  
Para Adelaide Guimarães

Dear Dr. Guimarães,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Ethnopharmacology

Title: ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF IMIDAZOLE ALKALOIDS FROM THE LEAVES OF *Pilocarpus microphyllus*: ROLE OF CYCLOOXYGENASE

Corresponding Author: LUZIA KALYNE ALMEIDA MOREIRA LEAL

Co-Authors: Maria Guimarães, TALITA ROCHA, Maria Goretti SILVA, RUI MOREIRA, RITA GUEDES, DAVID LIMA, Jose Leite

LUZIA KALYNE ALMEIDA MOREIRA LEAL submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=JEP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JEP)

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

**APÊNDICE E** – Artigo publicado no periódico internacional *Journal Ethnopharmacology*





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms



Patrick V. Quelemes<sup>a</sup>, Márcia L.G. Perfeito<sup>a</sup>, Maria A. Guimarães<sup>a</sup>,  
Raimunda C. dos Santos<sup>a</sup>, David F. Lima<sup>a,b</sup>, Carlos Nascimento<sup>c</sup>, Marcos P.N. Silva<sup>d</sup>,  
Maria José dos S. Soares<sup>e</sup>, Cristina D. Ropke<sup>f</sup>, Peter Eaton<sup>a,g</sup>, Josué de Moraes<sup>d</sup>,  
José Roberto S.A. Leite<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biodiversity and Biotechnology Research Center, Biotec, Federal University of Piauí, UFPI, 64202020 Parnaíba, PI, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Vale do São Francisco, UNIVASF, Paulo Afonso, BA, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Parasitology, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Center for Research on Neglected Diseases, University of Guarulhos, Guarulhos, SP, Brazil

<sup>e</sup> Department of Veterinary Morphophysiology, Federal University of Piauí, Teresina, PI 64049550, Brazil

<sup>f</sup> Phytobios, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, Barueri, SP, Brazil

<sup>g</sup> UCIBIO, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007 Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 March 2015

Received in revised form

5 August 2015

Accepted 19 September 2015

Available online 25 September 2015

#### Keywords:

*Azadirachta indica*

Neem leaf extract

Biofilm

*Schistosoma mansoni*

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** There are ethnopharmacological reports supporting the use of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf against bacterial and worm infections. However there is a lack of studies about its effect on bacterial biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. This study reports the *in vitro* effects of neem leaf ethanolic extract (Neem EE) on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm and planktonic aggregation formation, and against *S. mansoni* worms.

**Materials and methods:** Quantification of the Azadirachtin (AZA), thought to be one of their main compounds related to biological effects, was performed. The effect of sub-inhibitory concentrations of Neem EE on biofilm formation and planktonic aggregates of *S. aureus* was tested using the crystal violet dye method and atomic force microscopy (AFM) analysis, respectively. Changes in *S. mansoni* motor activity and death of worms were analyzed *in vitro* after exposition to the extract. Treated schistosomes were also examined using confocal laser scanning microscopy.

**Results:** It was observed the presence of AZA in the extract ( $0.14 \pm 0.02$  mg/L). Testing Neem EE sub-inhibitory concentrations, a significant biofilm adherence inhibition from 62.5  $\mu$ g/mL for a sensitive *S. aureus* and 125  $\mu$ g/mL for two MRSA strains was observed. AFM images revealed that as the Neem EE concentration increases (from 250 to 1000  $\mu$ g/mL) decreased ability of a chosen MRSA strain to form large aggregates. In relation of anti-schistosoma assay, the extract caused 100% mortality of female worms at a concentration of 50  $\mu$ g/mL at 72 h of incubation, while 300  $\mu$ g/mL at 24 h of incubation was required to achieve 100% mortality of male worms. The extract also caused significant motor activity reduction in *S. mansoni*. For instance, at 96 h of incubation with 100  $\mu$ g/mL, 80% of the worms presented significant motor activity reduction. By the confocal microscopy analysis, the dorsal surface of the tegument of worms exposed to 300  $\mu$ g/mL (male) and 100  $\mu$ g/mL (female) of the extract showed severe morphological changes after 24 h of treatment.

**Conclusions:** Neem leaf ethanolic extract presented inhibitory effect on MRSA biofilm and planktonic aggregation formation, and anthelmintic activity against *S. mansoni* worms.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** AFM, atomic force microscopy; ATCC, American Type Culture Collection; AZA, azadirachtin; CFU, colony forming unit; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; DMSO, dimethyl sulfoxide; FAA, formalin-acetic acid-alcohol solution; FT-MS, Fourier transform mass spectrometry; HPLC-FT-MS, liquid chromatography coupled to ultra-high-resolution mass spectrometry; MIC, minimum inhibitory concentration; Neem EE, neem leaf ethanolic extract; NMR, nuclear magnetic resonance; PZQ, praziquantel; SPE, solid-phase extraction; TSB, tryptic soy broth

\* Corresponding author.

E-mail address: [jrsaite@gmail.com](mailto:jrsaite@gmail.com) (J.R.S.A. Leite).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.026>

0378-8741/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**APÊNDICE F** – Artigo publicado no periódico internacional Carbohydrate Polymers



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)

## Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine



Sávia Francisca Lopes Dias<sup>a</sup>, Sylvania Siqueira Nogueira<sup>a</sup>, Flaviane de França Dourado<sup>a</sup>, Maria Adelaide Guimarães<sup>a</sup>, Nádia Aline de Oliveira Pitombeira<sup>c</sup>, Graciely Gomides Gobbo<sup>d</sup>, Fernando Lucas Primo<sup>d</sup>, Regina Célia Monteiro de Paula<sup>c</sup>, Judith Pessoa Andrade Feitosa<sup>c</sup>, Antonio Claudio Tedesco<sup>d</sup>, Lívio Cesar Cunha Nunes<sup>b</sup>, José Roberto Souza Almeida Leite<sup>a</sup>, Durcilene Alves da Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UFPI, Research Center in Biodiversity and Biotechnology – Biotech Campus Parnaíba, Federal University of Piauí, Av São Sebastião 2819, 64202-020 Parnaíba, Piauí, Brazil

<sup>b</sup> UFPI, Center for Pharmaceutical Technology, Federal University of Piauí, Terestina, Brazil

<sup>c</sup> UFC, Polymer Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>d</sup> USP, Department of Chemistry, Laboratory of Photobiology and Photomedicine, Center Nanotechnology and Tissue Engineering, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 October 2015

Received in revised form 30 January 2016

Accepted 1 February 2016

Available online 3 February 2016

#### Chemical compounds studied in this article:

Acetone (CID: 180)

Acetonitrile (CID: 6342)

Acetic anhydride (CID: 7918)

Diclofenac diethylamine (CID:115087)

Dimethyl sulfoxide (CID:679)

Ethanol (CID:702)

Formamide (CID: 713)

Phosphoric acid (CID:1004)

Pyridine (CID: 1049)

Sodium hydroxide (CID: 14798)

#### Keywords:

Nanoparticles

Acetylated cashew gum

Diclofenac diethyl amine

Cytotoxicity

Transdermal delivery

### ABSTRACT

Nanoprecipitation and dialysis methods were employed to obtain nanoparticles (NPs) of acetylated cashew gum (ACG). NPs synthesized by dialysis showed greater average size compared to those synthesized by nanoprecipitation, but they presented improved stability and yield. NPs were loaded with diclofenac diethylamine and the efficiency of the drug incorporation was over 60% for both methods, for an ACG:NP a weight ratio of 10:1. The cytotoxicity assay demonstrated that the NPs had no significant effect on the cell viability, verifying their biocompatibility. The release profile for the diclofenac diethylamine associated with the ACG-NPs showed a more controlled release compared to the free drug and a Fickian diffusion mechanism was observed. Transdermal permeation reached 90% penetration of the drug.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

**APÊNDICE G** – Artigo publicado no periódico internacional *Biomedicine & Pharmacotherapy*.



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<sup>a,b</sup>, Ana Carolina Mafud<sup>c</sup>, Leiz Maria Costa Vêras<sup>a</sup>,  
 Maria Adelaide Guimarães<sup>a,d</sup>, Lydia F. Yamaguchi<sup>e</sup>, David Fernandes Lima<sup>a,f</sup>,  
 Daniel Dias Rufino Arcanjo<sup>a</sup>, Massuo J. Kato<sup>e</sup>, Ronaldo Z. Mendonça<sup>g</sup>,  
 Pedro Luiz Silva Pinto<sup>h</sup>, Yvonne Primerano Mascarenhas<sup>c</sup>, Marcos P.N. Silva<sup>i</sup>,  
 Josué de Moraes<sup>i</sup>, Peter Eaton<sup>a,j</sup>, José Roberto de Souza de Almeida Leite<sup>a,k,\*</sup>

<sup>a</sup> Biodiversity and Biotechnology Research Center, Biotec, Federal University of Piauí, UFPI, Parnaíba, PI, 64202020, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Higher Education of Vale do Parnaíba, FAHESP/IESVAP, Parnaíba, PI, Brazil

<sup>c</sup> São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> Phytobios Nordeste LTDA, Centroflora Group, Parnaíba, PI, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>f</sup> Federal University of Vale do São Francisco, Paulo Afonso, BA, Brazil

<sup>g</sup> Laboratory of Parasitology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

<sup>h</sup> Enteroparasites Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil

<sup>i</sup> Research Center for Neglected Diseases, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil

<sup>j</sup> UCIBIQ/REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal

<sup>k</sup> Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 September 2016

Received in revised form 9 December 2016

Accepted 14 December 2016

#### Keywords:

Alkaloid

Drug combination

Piplartine

Epiisopiloturine

Praziquantel

Drug likeness

*Pilocarpus microphyllus*

*Schistosoma mansoni*

### ABSTRACT

Schistosomiasis is a world health problem, and praziquantel is the only drug currently used for the treatment. There is some evidence that extensive monotherapy of praziquantel may be leading to drug resistance in the parasite. In order to find alternative treatments, the effects of the combination of epiisopiloturine (EPI), piplartine (PPT) and praziquantel (PZQ) were evaluated. Similarity analysis of these compounds was performed using optimized molecular structures to compare the shape and the charge modeling of combinations between PZQ and EPI or PPT. Supported by this data, *in vitro* association of PZQ-PPT, PZQ-EPI, and EPI-PPT was carried out, and the activity of these combinations against *Schistosoma mansoni* was assessed. The results showed synergistic activity with a combination index (CI) of 0.42 for the treatment with PZQ-PPT. Both PZQ-EPI and EPI-PPT combinations also showed synergistic effects, with CI values of 0.86 and 0.61, respectively. Surface alterations in the tegument of adult schistosomes after the treatments were observed using laser confocal microscopy and scanning electron microscopy. Additionally, the association of EPI-PPT decreased the cytotoxicity when compared with both isolated compounds in three different lines of mammalian cells. Thus, synergistic combinations of PZQ-PPT, PZQ-EPI, and EPI-PPT create the possibility of reduced doses to be used against *Schistosoma mansoni*.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.