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

Caroline Priamo Gama

AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE *Renealmia petasites* Gagnep (ZINGIBERACEAE) E *Vernonia polyanthes* (ASTERACEAE)

Juiz de Fora
2023

Caroline Priamo Gama

AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE *Renealmia petasites* Gagnep (ZINGIBERACEAE) E *Vernonia polyanthes* (ASTERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho.

Juiz de Fora

2023

Priamo Gama, Caroline.
AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DE Renealmia petasites Gagnep (ZINGIBERACEAE) E Vernonia polyanthes (ASTERACEAE) / Caroline Priamo Gama. -- 2023.
111 p.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Esquistossomose. 3. Renealmia petasites. 4. Vernonia polyanthes. 5. Produtos naturais. I. Alves da Silva Filho, Ademar, orient. II. Título.

Caroline Priamo Gama

Avaliação esquistossomicida de extratos e substâncias de *Renealmia petasites* Gagnep (ZINGIBERACEAE) e *Vernonia polyanthes* (ASTERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 21 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ademar Alves da Silva Filho - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Carla Monteiro Leal
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 20/11/2023.

Documento assinado eletronicamente por **Ademar Alves da Silva Filho**, **Professor(a)**,

em 21/12/2023, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carla Monteiro Leal**, **Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto**, **Professor(a)**, em 29/12/2023, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1584212** e o código CRC **2C80AC9A**.

Para a minha fonte de amor, inspiração e força: meus pais Maria Auxiliadora e Sebastião e meu amor Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as bençõe e realizações concedidas. Sem Ele, eu nada seria.

Aos meus pais Maria Auxiliadora e Sebastião, pelo amor incondicional e apoio nos momentos bons e ruins, essa conquista é de vocês.

Agradeço aos meus tios Aloisio, Rosanna, Luzia, Eufrasia e Antônio (*in memorian*) e primos Eduardo e Marcos Paulo, por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu noivo Gabriel, por todo amor, suporte, força e motivação nos momentos de desanimo e por sempre vibrar com cada conquista.

Aos meus amigos Marcela, Wemerson e Raiara obrigada por estarem sempre perto, me apoiando durante essa jornada, vocês estarão sempre comigo.

Agradeço também aos amigos que o laboratório NIPPAN me proporcionou, especialmente a Joyce minha parceira de laboratório, obrigada por tudo e por tanto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ademar por acreditar nesse projeto e compartilhar comigo todas as experiências e conhecimentos. Obrigada por proporcionar momentos importantes para minha vida acadêmica e profissional.

E gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu amigo Gil Aguiar e toda a sua família, especialmente ao senhor José Gomes de Aguiar (i*n memorian*), por compartilharem comigo esse conhecimento e por me permitirem participar dessa história de família e de amor, muito obrigada.

À FAPEMIG (Processos APQ 00705-22 e APQ 03773-22) pelo apoio financeiro deste projeto.

“Você é o sonho dos seus ancestrais” (Bert Hellinger),

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada pelo parasita do gênero *Schistosoma*, particularmente *S. mansoni*. Atualmente, o praziquantel (PZQ) é a única ferramenta farmacológica para o controle da doença. Além disso, apresenta alcance limitado em relação as formas do ciclo biológico do parasita e já existem relatos de resistência ao uso deste fármaco. Neste sentido, a medicina tradicional pode se tornar uma importante aliada na busca por novas substâncias ou extratos com atividade esquistossomicida. Nesse contexto encontram-se as espécies *Renealmia petasites* Ganep, no qual os rizomas são utilizados pela população para fins antiparasitários, analgésicos e para o tratamento de desordens intestinais bem como a espécie *Vernonia polyanthes* que possui indicação etnobotânica como expectorante, para o tratamento de doenças inflamatórias e parasitárias. Nesse contexto, considerando o uso popular de ambas espécies, os objetivos do presente trabalho foram realizar a avaliação esquistossomicida do extrato hidroalcoólico dos rizomas de *R. petasites* e do extrato foliar em diclorometano de *V. polyanthes,* bem como de substâncias isoladas destes extratos. De acordo com os resultados, foram obtidas duas substâncias semipurificadas a partir de *R. petasites*, as quais ainda não foram identificadas. Além disso, o extrato proveniente dos rizomas frescos de *R. petasites* apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, mas em ensaios *in vivo*, na dose de 400 mg/kg, este extrato não foi capaz de reduzir o número de vermes ou de ovos em animais infectados com *S. mansoni*. A partir do extrato foliar de *V. polyanthes* foi isolada a lactona sesquiterpênica Glaucolido A – codificado como GLDA. Em ensaios *in vitro*, tanto o extrato de *V. polyanthes* quanto o Glaucolido A (GLDA), em concentrações de 12,5 µg/mL, foram capazes de causar a morte de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*. Finalmente, este estudo contribuiu para dar suporte ao uso medicinal antiparasitário das espécies estudadas, revelando o GLDA como um composto promissor a ser explorado em estudos esquistossomicidas futuros.

Palavras chaves: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; *Renealmia petasites*, *Vernonia polyanthes*; Produtos naturais.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease (NTD) caused by the parasite of the genus Schistosoma, particularly *S. mansoni*. Currently, praziquantel (PZQ) is the only pharmacological tool for disease control. However, its scope is limited in relation to the biological cycle forms of the parasite, and there are reports of resistance to the use of this drug. In this sense, traditional medicine can become an important ally in the search for new substances or extracts with schistosomicidal activity. In this context, the species *Renealmia petasites* Ganep stands out, where rhizomes are used by the population for antiparasitic, analgesic purposes, and for the treatment of intestinal disorders, as well as the species *Vernonia polyanthes*, which has ethnobotanical indications as an expectorant and for the treatment of inflammatory and parasitic diseases. Considering the popular use of both species, the objectives of this study were to evaluate the schistosomicidal activity of the hydroalcoholic extract of *R. petasites* rhizomes and the dichloromethane leaf extract of *V. polyanthes*, as well as isolated substances from these extracts. According to the results, two semipurified substances were obtained from *R. petasites*, which have not been identified yet. Furthermore, the extract from fresh rhizomes of *R. petasites* showed *in vitro* schistosomicidal activity at concentrations of 100 µg/mL and 200 µg/mL, but in *in vivo* assays at a dose of 400 mg/kg, this extract was not able to reduce the number of worms or eggs in animals infected with *S. mansoni*. From the leaf extract of *V. polyanthes*, the sesquiterpene lactone Glaucolide A, coded as GLDA, was isolated. In *in vitro* assays, both the extract of V. polyanthes and Glaucolide A (GLDA) at concentrations of 12.5 µg/mL were able to cause the death of adult male and female *S. mansoni* worms. Finally, this study contributed to supporting the antiparasitic medicinal use of the species studied, revealing GLDA as a promising compound to be explored in future schistosomicidal studies.

Keywords: Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; *Renealmia petasites*; *Vernonia polyanthes*; Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estado da esquistossomose nos países endêmicos em 2021.	18
Figura 2:	Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil - 2009-2020.	19
Figura 3:	Estrutura química do praziquantel.	21
Figura 4:	Exemplo de substâncias identificadas em *R. petasites*.	25
Figura 5:	Espécie vegetal *Renealmia petasites* Ganep no local de coleta.	32
Figura 6:	Espécie vegetal *Vernonia polyanthes* no local de coleta.	33
Figura 7:	Rizomas higienizados de *R. petasites.*	34
Figura 8:	Maceração dos rizomas de *R. petasites.*	35
Figura 9:	Rotaevaporação do extrato bruto.	35
Figura 10:	Processo de obtenção de VPL.	36
Figura 11:	Fracionamento por CLV do extrato VPL.	40
Figura 12:	Cromatogramas de RPS e RPF, respectivamente, por CLAE-DAD avaliados em 230 nm.	45
Figura 13:	Comparação entre os cromatogramas de RPS e RPF, respectivamente, por CLAE-DAD – avaliados em 280 nm.	46
Figura 14:	Fluxograma da partição líquido-líquido de RPF.	54
Figura 15:	Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos e partições de *R. petasites.*	55
Figura 16:	Cromatograma de RPF 01 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm, respectivamente.	56
Figura 17:	Fluxograma do fracionamento por coluna da fração RPF 01.	58
Figura 18:	Precipitado formado na subfração RPF 1.3.	59
Figura 19:	CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 01.	59
Figura 20:	Cromatograma de RPF 1.3 - avaliado em 230 nm e 280 nm.	60
Figura 21:	Cromatograma de RPF 02 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.	61
Figura 22:	Fluxograma do fracionamento por coluna da fração RPF 02.	62
Figura 23:	CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 02.	63
Figura 24:	Cromatograma de RPF 03 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.	64

Figura 25:	Fluxograma do fracionamento por coluna de RPF 03.	65
Figura 26:	CCD das frações obtidas a partir de RPF 03.	66
Figura 27:	Fluxograma do fracionamento por coluna da subfração RPF 367.	67
Figura 28:	CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 367.	68
Figura 29:	Cromatograma de RPF 04 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.	69
Figura 30:	Fluxograma do fracionamento por exclusão de tamanho – RPF 04.	70
Figura 31:	Cromatografia em camada delgada das frações obtidas pela separação em Sephadex de RPF 04.	71
Figura 32:	Cromatograma de RPF 4.4 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.	72
Figura 33:	Fluxograma da representação parcial do fracionamento por coluna de RPF 04.	73
Figura 34:	Precipitado obtido na fração RPF 4.F34.	74
Figura 35:	CCD dos tubos 19 – 50 obtidos por cromatografia clássica.	74
Figura 36:	Efeito na carga parasitária em dose única de RPF.	77
Figura 37:	Efeitos nos estágios de desenvolvimento do ovo após dose única de RPF (A) e Efeito da dose única de RPF sobre a carga de ovos (B).	78
Figura 38:	Efeito no peso do fígado e do baço após dose única de RPF.	79
Figura 39:	Comparação cromatográfica por CCD do extrato VPL e o padrão de Glaucolido A.	81
Figura 40	CCD das frações que apresentaram o composto de interesse frente ao padrão de Glaucolido A.	83
Figura 41:	CCD das subfrações obtidas a partir do fracionamento de VPL-5.	83
Figura 42:	Cristais formados a partir da recristalização de VPL 40 – 60.	84
Figura 43:	Fluxograma do processo de obtenção de GLDA.	85
Figura 44:	Análise cromatográfica do glaucolido A.	86
Figura 45:	Análise cromatográfica de VPL.	87

Figura 46: Análise cromatográfica de GLDA. 87

Figura 47: Estrutura química do Glaucolido A. 88

Figura 48: Espectro de RMN de ^{1}H de GLDA (500 MHz, $CDCl_3$). 89

Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C de GLDA (125 MHz, $CDCl_3$). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Gradiente de eluição utilizado para análise das amostras por CLAE-DAD.	42
Tabela 2:	Perfil cromatográfico dos picos observados em RPS em 230 nm.	47
Tabela 3:	Perfil espectroscópico dos picos observados em RPF em 230 nm.	48
Tabela 4:	Perfil espectroscópico dos picos observados em RPS em 280 nm.	49
Tabela 5:	Perfil espectroscópico dos picos observados em RPF em 280 nm.	50
Tabela 6:	Substâncias químicas identificadas em *R. petasites* por Soares *et al*. 2021.	52
Tabela 7:	Resultados da avaliação *in vitro* das amostras de *R. petasites* contra vermes adultos de *S. mansoni.*	76
Tabela 8:	Descrição do gradiente de fracionamento e subfrações recolhidas	82
Tabela 9:	Subfrações finais obtidas a partir do fracionamento de VPL por CLV	82
Tabela 10:	Subfrações de VPL-5 com suas respectivas massas	84
Tabela 11:	Dados obtidos de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da substância GLDA e dados do glaucolido A descritos na literatura.	91
Tabela 12:	Dados obtidos de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) da substância GLDA e dados do glaucolido A descritos na literatura.	94
Tabela 13:	Resultados da avaliação *in vitro* das amostras de *V. polyanthes* contra vermes adultos de *S. mansoni.*	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada;

CLAE - DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo.

GLDA – Glaucolido A;

PQZ - praziquantel;

Rf - *Retention factor* (fator de retenção);

RMN – Ressonância magnética nuclear;

RPF - Extrato bruto fresco de *R. petasites;*

RPF 01 - Partição de RPF em hexano;

RPF 02 - Partição de RPF em diclorometano;

RPF 03 - Partição de RPF em acetato de etila;

RPF 04 - Partição de RPF em metanol: água;

RPF 3.52 - Subfração de RPF 03;

RPF 3.55 - Subfração de RPF 03;

RPF 3.58 - Subfração de RPF 03;

RPF 4.1 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPF 4.2 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPF 4.3 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPF 4.4 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPF 4.5 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPF 4.6 - Subfração de RPF 04 por exclusão de tamanho;

RPS - Extrato bruto de rizomas de *R. petasites*;

SISPCE - Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose;

UV - Ultraviolet

VPL – extrato bruto foliar de *V. polyanthes*.

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem;

°C: Graus Celsius;

µg/g: microgramas por grama;

µL: Microlitro;

cm: Centímetro;

g: gramas;

mg: miligramas;

mg/mL: miligramas por mililitro;

mL: mililitro;

mm: Milímetros;

RPM: Rotação por minuto.

v/v: volume por volume;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1. ESQUISTOSSOMOSE 18

1.2. PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA 22

1.2.1. Família Zingiberaceae e a espécie *Renealmia petasites* Gagnep 23

1.2.2. Família Asteraceae e a espécie *Vernonia polyanthes* Less 26

2. OBJETIVOS 29

2.1. OBJETIVO GERAL 29

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

3. MATERIAL E MÉTODOS 30

3.1. INSTRUMENTAÇÃO 30

3.2. MATERIAIS UTILIZADOS 31

3.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *Renealmia petasites* 32

3.4. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *Vernonia polyanthes* 33

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Renealmia petasites* Gagnep 34

3.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Vernonia polyanthes* 36

3.7. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO RPF 37

3.7.1. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 01 por cromatografia em coluna 38

3.7.2. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 02 por cromatografia em coluna 38

3.7.3. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 03 por cromatografia em coluna 38

3.7.4. Fracionamento cromatográfico das subfrações RPF 367 por cromatografia em coluna 38

3.7.5. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 04 por cromatografia de exclusão 39

3.7.6. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 04 por cromatografia em coluna 39

3.8. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Vernonia polyanthes* (VPL) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA À VÁCUO (CLV): 40

3.8.1. Fracionamento cromatográfico de VPL - 5 por cromatografia em coluna clássica 40

3.8.2. Recristalização de VPL 40 – 60 41

3.9. ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE-DAD 41

3.10. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA GLDA. 42

3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* . 42

3.11.1. Parasitas, hospedeiros e manutenção do ciclo de *S. mansoni* 43

3.11.2. Ensaios *in vitro* com vermes adultos de *Schistosoma mansoni* 43

3.12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO* 44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE A ESPÉCIE VEGETAL *R. petasites* ... 45

4.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS POR CLAE-DAD 45

4.2. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE RPF 53

4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 01 E SUBFRAÇÕES 55

4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 02 60

4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 03 E SUBFRAÇÕES 63

4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 04 68

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. mansoni.* 75

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO RPF CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. mansoni.* 77

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE A ESPÉCIE VEGETAL *V. polyanthes* 81

5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO BRUTO 81

5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUITOSSOMICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO BRUTO E GLDA CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*.....95

6. CONCLUSÕES FINAIS.....98

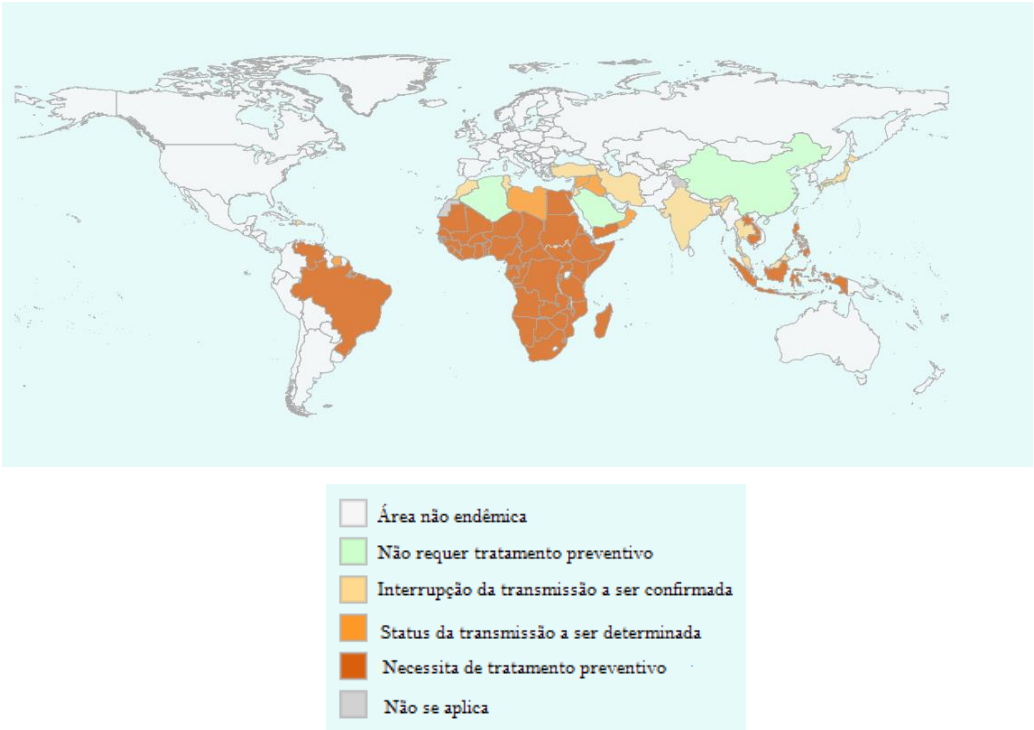
REFERÊNCIAS.....99

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença parasitária, causada por diversas espécies do gênero *Schistosoma.* Apesar da prevalência em regiões tropicais e subtropicais, a doença atinge cerca de 78 países, sendo que 240 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, como pode ser observado na Figura 1 (WHO, 2021).

Figura 1 – Estado da esquistossomose nos países endêmicos em 2021.



Fonte: Adaptado de WHO, 2021.

A esquistossomose é uma das principais doenças parasitárias em dados de morbidade e mortalidade. A forma intestinal da doença é provocada pelas espécies *S. mansoni, S. japonicum, S. mekongi, S. guineensis e S. intercalatum* (WHO, 2023).

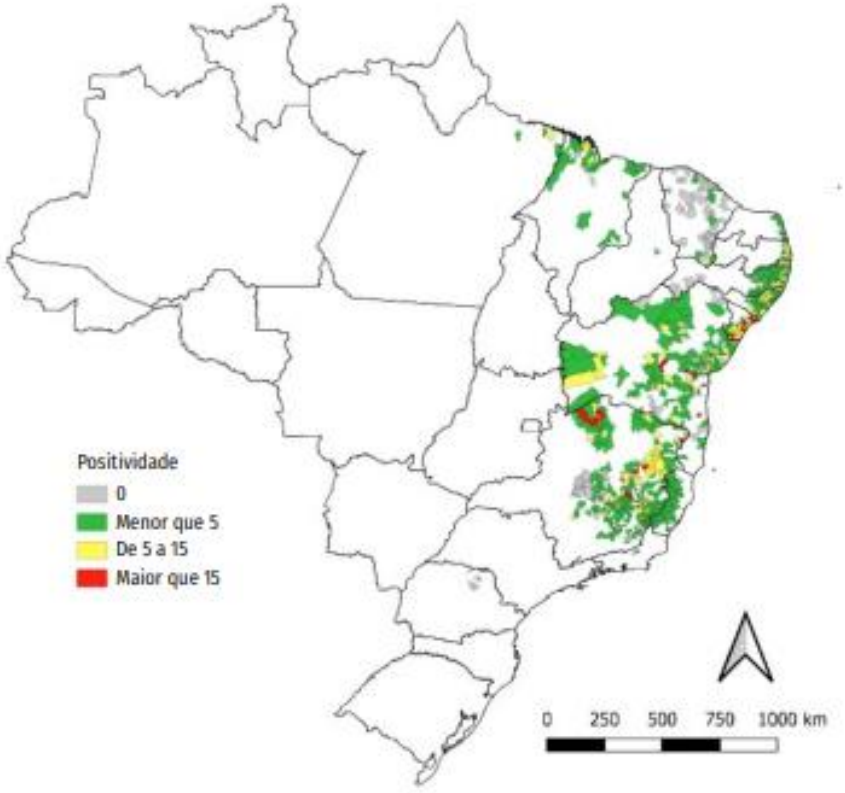
No Brasil, conhecida popularmente como “xistose”, “barriga d´água” ou “doença do caramujo”, a doença é provocada exclusivamente pela espécie *S. mansoni* que possui como hospedeiro intermediário, o caramujo *Biomphalaria glabrata.* A prevalência da doença está associada as áreas onde há maior presença do molusco transmissor, bem como baixo desenvolvimento econômico e social, devido as

condições precárias de saneamento básico e acesso a água potável (Brasil, 2023; WHO, 2023).

A esquistossomose está presente em 19 estados brasileiros (Figura 2). Com predominância nas regiões Nordeste e Sudeste, 8 estados são áreas de transmissão endêmica, como Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais e outros 11 são considerados de transmissão focal - Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, sendo Minas Gerais o estado de maior prevalência. É importante destacar que 1,5 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença no país (Silva *et al*., 2018; Brasil, 2023).

Ainda, de acordo com a Figura 2, Minas Gerais é o estado mais atingido pela doença na região sudeste. Dados demonstram a redução na taxa de mortalidade no estado, entretanto, algumas áreas como Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Vale do Rio Doce apresentaram aglomerados de alto risco (Da Silva 2020; Silva *et al*., 2018).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município - Brasil, 2009-2020.



Fonte: Boletim Epidemiológico – Ministério da Saúde, 2021.

O platelminto *Schistosoma mansoni* apresenta dimorfismo sexual e o ciclo biológico do parasita tem início com a maturação dos vermes adultos, os quais alcançam o sistema vascular do hospedeiro definitivo - ser humano - e seguem até as veias mesentéricas. Nas submucosas, as fêmeas depositam ovos que levam aproximadamente uma semana para amadurecer, dando origem ao miracídio, que migra para a luz intestinal nesse período (Lombardo *et al*., 2019).

Os ovos, a partir da luz intestinal, são liberados no meio externo por meio das fezes. Em condições adequadas, como altas temperaturas, luz intensa e oxigenação, ocorre a liberação dos miracídios que penetram nos caramujos do gênero *Biomphalaria* presentes no ambiente (McManus *et al*., 2020).

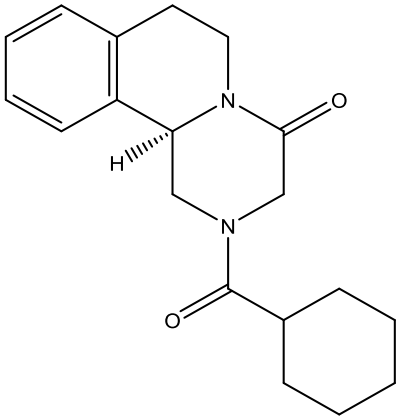
No interior dos caramujos, os miracídios alcançam a forma evolutiva de esporocistos, que por meio de reprodução assexuada geram larvas chamadas cercárias, as quais, ao entrar em contato com o ser humano, penetram ativamente na pele e mucosa, utilizando suas ventosas e secreções histolíticas. Após a penetração, as cercárias perdem a cauda bifurcada, tornando-se esquistossômulos, que se dirigem aos vasos sanguíneos, alcançando o sistema porta hepático para alimentação e maturação em vermes unissexuados. Em seguida, migram para a artéria mesentérica, reiniciando o ciclo (Schwartz *et al*., 2018).

Os ovos que não atingem a luz intestinal são transportados até o fígado ou atingem órgãos como pulmões e sistema nervoso central. São diversos os impactos causados, como esplenomegalia, danos no sistema porta, além de hipertensão pulmonar, obstrução do sistema vascular bem como alterações no sistema nervoso central. Dessa forma, lesões irreversíveis podem ser causadas gerando a morte do indivíduo (Schwartz *et al*., 2018).

Em áreas endêmicas, a Organização Mundial da Saúde recomenda tanto para o tratamento quanto para o tratamento preventivo em crianças e trabalhadores de risco, o fármaco praziquantel (PZQ) em uma dose de 50 mg/kg para adultos e 60 mg/kg para crianças (WHO, 2023, Carvalho *et al.*, 2022).

O PZQ é um derivado pirazilisoquinolínico (Figura 3) no qual o mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, porém, de acordo com dados da literatura, a hipótese mais aceita é que o PZQ atua como antagonista dos canais de cálcio dependentes de voltagem do parasita e, como resultado, ocorre um influxo descontrolado de íons de cálcio gerando contração muscular desacerbada e, consequentemente, paralisia e morte dos parasitas (Thomas *et al*., 2020).

Figura 3 – Estrutura química do praziquantel.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Apesar da segurança, eficácia e baixo custo do PZQ, este fármaco é a única alternativa para o tratamento da doença, entretanto já existem dados que sugerem a possível existência de cepas resistentes ao medicamento, além da dificuldade de adesão ao tratamento devido as reações adversas. Nesse contexto, torna-se importante e urgente a busca por novas substâncias com atividade esquistossomicida (McManus *et al*., 2018; WHO, 2023; Carvalho *et al.*, 2022).

1.2. PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

A atividade biológica dos produtos naturais sempre foi de grande interesse para a humanidade. Desde os tempos remotos, através da medicina popular, o ser humano busca na biodiversidade a cura para doenças. O Brasil é reconhecido mundialmente como detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo, destacando-se também por sua medicina tradicional que transmite, de geração em geração, as propriedades das espécies vegetais. Tais propriedades e conhecimento são a base para o desenvolvimento de diversos produtos farmacêuticos, principalmente para o tratamento de doenças parasitárias, como por exemplo os medicamentos antiparasitários desenvolvidos a partir de derivados vegetais como a artemisinina e cloroquina, bem como aqueles isolados de microrganismos *Streptomyces* – como a anfotericina B e a ivermectina (Ekiert e Szopa, 2020; De Morais, 2015).

Considerando a esquistossomose uma doença que apresenta limitação farmacoterapêutica, torna-se importante e urgente a descoberta de novas substâncias com atividade esquistossomicida e consequentemente o desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse sentido, os produtos naturais são uma importante fonte para busca de substâncias com atividade esquistossomicida (De Moraes, 2015).

Nesse contexto, a espécie *Cucurbita pepo,* conhecida popularmente como abóbora, demonstrou atividade *in vitro* frente a esquistossômulos e formas parasitárias jovens e adultas de *S. mansoni.* Além disso, durante a avaliação *in vivo*, o óleo obtido a partir das sementes da espécie promoveram uma significativa redução de ovos no fígado e intestino, além da redução de granuloma e fibrose (Beshay *et al*., 2019).

Já o extrato de Capeeba (*Pothomorphe umbellata*), é amplamente utilizado pela medicina popular para o tratamento da malária e doenças hepáticas. O principal metabólito do extrato, o 4-nerolidilcatecol, apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e além disso é capaz de modular a produção de hemozoína que consequentemente elevam os níveis de heme que são tóxicos ao *S. mansoni* (Costa *et al*., 2019; Rocha e Silva *et al*., 2016).

Carvalho *et al*., 2019 demonstraram a atividade esquistossomicida do extrato de *Ruta graveolens* bem como a fração rica em alcaloides frente a vermes adultos de *S. mansoni.*

Muya *et al*., 2023 descreve que os extratos metanólicos obtidos a partir de rizomas de *Aframomum alboviolaceum* (Ridl.) K.Schum (família Zingiberaceae) e das cascas

das raízes de *Baccharoides adoensis* (Sch.Bip. ex Walp.) H.Rob. demonstraram atividade esquistossomicida em concentrações de cerca de 50 µg/mL.

As espécies vegetais são uma grande fonte de substâncias com atividade esquistossomicida, nesse sentido, torna-se válido ensaios biológicos bem como a identificação dessas substâncias, considerando a grande necessidade de novos agentes para o tratamento da esquistossomose. Nesse contexto, este trabalho irá avaliar a atividade esquistossomicida de duas espécies – *Renealmia petasites* (Zingiberaceae) e *Vernonia polyanthes* (Asteraceae), devido a indicação etnobotânica e as estudos pré-clínicos descritos para espécies dessas mesmas famílias (De Albuquerque *et al*., 2020; Lira *et al*., 2023).

1.2.1. Família Zingiberaceae e a espécie *Renealmia petasites* Gagnep

A família Zingiberaceae é uma das principais famílias do grupo das Angiospermas, possuindo cerca de 53 gêneros, no qual abriga mais de 1600 espécies distribuídas por regiões tropicais, principalmente na África e América. Dentre os principais gêneros pertencentes a essa família, destacam-se: *Alpinia, Curcuma, Renealmia e Zingiber* (https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000651-2023-12?page=1, acesso em 27/02/2022).

As espécies dessa família possuem grande importância econômica por serem usadas como especiarias, plantas ornamentais, em cosméticos, na medicina tradicional e também em rituais religiosos. Popularmente, estas plantas são indicadas para tratamento de doenças inflamatórias, câncer, picadas de cobra, infecções fúngicas e bacterianas, tratamento de desordens do trato gastrointestinal e doenças parasitárias. Além disso, alguns destes usos já foram comprovados, como as atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana, anticancerígena e antiparasitária (Mans *et al*., 2019).

Considerando a ampla indicação terapêutica da família Zingiberaceae, ainda assim a atividade antiparasitária das espécies vegetais e das substâncias isoladas se destacam. Como a *Kaempferia galanga*, que além do uso ornamental, é indicada pela população para o tratamento de doenças inflamatórias, bacterianas e parasitárias, sendo que todas essas indicações já foram comprovadas cientificamente (Mans *et al*., 2019). Além disso, Sulistyowaty *et al*., 2021 demonstraram a atividade leishmanicida do extrato em acetato de etila obtido a partir dos rizomas de *Alpinia galanga*.

Dentre as centenas de compostos identificados na família Zingiberaceae, há destaque para a curcumina, um diarilheptanoide ativo presente em *Curcuma longa,* que apresentou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* (Magalhães *et al*., 2009).

Já o 10-gingerol, isolado a partir de *Zingiber officinale* demonstrou atividade frente ao protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* bem como atividade esquistossomicida de substâncias derivadas do mesmo (Guo *et al*., 2019; Hamdy *et al*., 2021).

Dentre as espécies vegetais pertencentes à família Zingiberaceae, aquelas do gênero *Renealmia* também apresentam importantes indicações terapêuticas, como *Renealmia alpinia* (Rottb.) Mass. Dos rizomas e folhas de *R. alpinia,* conhecida popularmente como alpínia, são obtidas preparações popularmente utilizadas para o tratamento de sintomas de mordidas de cobras e escorpiões, além de infecções bacterianas e desordens gastrointestinais. Alguns compostos foram identificados no óleo essencial obtido dos rizomas, como β-pineno e limoneno. Já aos diterpenos, especialmente do núcleo lábdano e aos diarilheptanoides foi atribuída a atividade antiparasitária frente aos parasitas *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *L. (L.) amazonenses*, bem como frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina (Mans *et al*., 2019).

Outra espécie de grande importância na medicina tradicional é *Renealmia petasites* Gagnep.

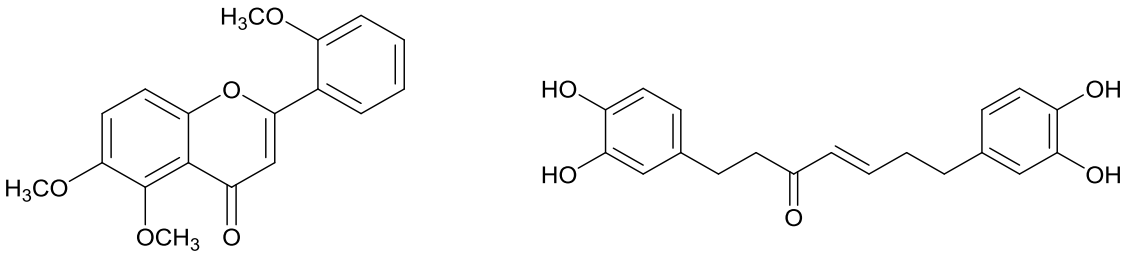
Renealmia petasites Gagnep, conhecida popularmente como “pacová” ou “pacová-de-macaco”, é a única espécie do gênero nativa do Brasil. O extrato hidroalcoólico dos rizomas de *R. petasites* são popularmente utilizados para o tratamento de dores articulares, enquanto as infusões das sementes são indicadas para desordens do trato gastrointestinal, tratamento de doenças parasitárias e para a infertilidade (Lopes 2010).

Apesar de ter seu uso amplamente difundido na medicina tradicional, são poucos os dados de literatura que identificaram as substâncias presentes em *R. petasites* e os correlacionaram com a indicação terapêutica tradicional.

Soares *et al*., 2021 demostraram a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos obtidos dos rizomas e das folhas secas de *R. petasites*. De acordo com os resultados, os extratos bloquearam os radicais livres e inibiram a ação intracelular provocada por mediadores do processo inflamatório, com alta inibição de

oxido nítrico, TNF-α e IL-6, principalmente para os rizomas secos. Além disso, os autores identificaram a presença de flavonoides e diarilheptanoides, como a 5,6,2′-trimetoxiflavona e a hirsutanona (Figura 4).

Figura 4 – Exemplo de substâncias identificadas em *R. petasites*.



5,6,2'–Trimetoxiflavona

Hirsutanona

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Além disso, Santos *et al*., 2021 determinaram a composição de lipídios e terpenos obtidos a partir dos extratos das sementes de *R. petasites*. De acordo com os autores, o ácido oleico, ácido palmítico e esteárico são os principais lipídeos encontrados no extrato, sendo que já existem estudos demonstrando a atividade antimicrobiana para o ácido oleico (Santos *et al.,* 2021).

Entre os terpenos majoritários do extrato de *R. petasites*, encontram-se o 2-careno, espatulenol e o labdadieno. De acordo com a literatura, o 8(17),12E-labdadieno-15,16-diol (labdadieno) foi identificado no extrato hexânico obtido de rizomas frescos da espécie vegetal *Siphonochilus aethiopicus* (Schweinf) B.L Burtt, também pertencente à família Zingiberaceae, e apresentou resultado significativo frente ao parasita *Trypanosoma brucei* (Igoli *et al*., 2012; Santos *et al*., 2021).

Nesse sentido, considerando o uso popular antiparasitário dos rizomas de *R. petasites,* bem como a importância desta espécie medicinal, torna-se válido o estudo pela busca de amostras e compostos esquistossomicidas provenientes de *R. petasites Gagnep*.

1.2.2. Família Asteraceae e a espécie *Vernonia polyanthes* Less

A família Asteraceae é uma das maiores do grupo das Angiospermas e possui grande importância econômica, medicinal e ornamental. Conhecida por possuir mais espécies vegetais que apresentam flores, essas são divididas em 1800 gêneros e cerca de 25000 espécies espalhadas por todo o mundo (https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000146-2023-12?page=1, acesso em 15/08/2023).

As espécies da família Asteraceae são de grande importância para medicina tradicional como por exemplo *Matricaria chamomilla* (camomila) e *Tanacetum parthenium* (crisântemo de jardim) que apresentam atividade anti-inflamatória e antisséptica, respectivamente, enquanto a *Vernonia amygdalina* possui propriedades antibacteriana e antitumoral (Yien *et al*., 2023).

Diversos compostos foram identificados em espécies de Asteraceae, como polifenóis, ácidos fenólicos, flavonoides e, especialmente, lactonas sesquiterpênicas (Dumas *et al*., 2021).

Considerando a ampla variedade da família Asteraceae, alguns gêneros se destacam, como *Vernonia*, que possui cerca de 1000 espécies, considerado um dos maiores representantes da família no Brasil (Dumas *et al*., 2021).

O gênero *Vernonia* apresenta cerca de 1000 espécies que estão distribuídas em todo o mundo, desenvolvendo-se em diferentes e variados climas, mas prevalecem em regiões tropicais. Morfologicamente suas espécies são classificadas anuais, herbáceas, perenes, lianas, arbustos e árvores com metros de altura (Toyang e Verpoorte, 2013; Gallon *et al*., 2018). Quimicamente, as espécies do gênero são caracterizadas pela presença de flavonoides e lactonas sesquiterpênicas (LSTs), sendo essas últimas pertencentes principalmente à classe dos germacranolidos (Toyang e Verpoorte, 2013 e Gallon *et al*., 2018).

Com relação às LSTs, estas desempenham funções protetoras contra herbívoros ou microrganismos em plantas. Por esse motivo, as LSTs estão presentes principalmente nos tricomas glandulares das partes aéreas de plantas da família Asteraceae (Padilla-Gonzalez *et al*., 2016).

Diversas espécies do gênero *Vernonia* são utilizadas pela população, como por exemplo a *V. condensata*, popularmente conhecida como boldo-africano, que é utilizada em desordens gastrointestinais. Já a *V. scorpiodes* (Lam.) Pers, também chamada de erva-de-São-Simão, é indicada para o tratamento de feridas, úlceras e

doenças de pele, enquanto a espécie *V. amygdalina* é usada popularmente para o tratamento de esquistossomose, malária e diabetes (Machado *et al*., 2013; Jayaweera *et al*., 2022).

Dentre as diversas espécies pertencentes ao gênero *Vernonia*, *Vernonia polyanthes* é uma das principais representantes do gênero no Brasil. Com sinonímia *Vernonanthura polyanthes* (Sprengel) Vega & Dematteis a espécie é nativa do Brasil, possuindo registros de distribuição principalmente entre as regiões nordeste, sudeste, centro-oeste e sul do país (https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/357743 acesso em 19/11/2023).

De acordo com a monografia disponibilizada pelo Ministério da Saúde 2014, a espécie se apresenta como uma planta arbustiva com uma média de 2,5 m de altura, com ramos sulcados. As folhas são verdes com coloração mais clara na face abaxial, simples alternadas e lanceoladas. As flores podem apresentar coloração branca ou rosadas. Em relação as principais características microscópicas da espécie está a presença de tricomas em ambas as faces da lâmina foliar (Ministério da Saúde, 2014).

Presente na relação nacional de medicamentos fitoterápicos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) – RENISUS, *V. polyanthes* é conhecida popularmente como “assa-peixe”, “assa-peixe-branco” ou “cambará-branco” (Ministério da Saúde, 2014).

Na medicina tradicional, *V. polyanthes* é utilizada para o tratamento de processos infecciosos e inflamatórios, feridas, queimaduras, doenças do sistema respiratório e renal, bem como anti-helmíntica (Temponi *et al*., 2012). Além disso, já existem algumas avaliações em relação a atividade diurética, hipotensora, antiulcerogênica, antirreumática, antimicrobiana, cicatrizante, anti-inflamatória, bem como indicações para o tratamento de malária e febre (Minateli *et al*., 2017; Santana *et al*., 2023).

Rodrigues *et al*., 2016, identificaram as substâncias luteolina, apigenina e rutina no extrato obtido a partir das folhas de *V. polyanthes*. De acordo com os resultados, ambos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória tópica em edema cutâneo de orelha.

Santana *et al*., 2023, isolaram e identificaram a lactona sesquiterpênica glaucolido A como a substância majoritária do extrato foliar obtido de *V. polyanthes*. De acordo com os autores, a substância isolada apresentou atividade bacteriostática contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 29213.

Além disso, considerando o uso etnobotânico da espécie, a atividade leishmanicida foi comprovada por Moreira *et al*., 2017, os quais avaliaram a atividade antiparasitária do óleo essencial de *V. polyanthes* contra as formas promastigotas de *Leishmania infantum,* com a concentração de IC_{50} de aproximadamente 19,4 µg/mL.

Considerando o uso popular de espécies do gênero *Vernonia,* incluindo *V. polyanthes*, como anti-helmíntico (Temponi *et al*., 2012) e o potencial de atividade antiparasitária descrita para a espécie, torna-se relevante a avaliação da atividade esquistossomicida do extrato e de compostos de *V. polyanthes* frente a *S. mansoni*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade esquistossomicida do extrato dos rizomas de *Renealmia petasites Gagnep* e do extrato foliar de *Vernonia polyanthes*, bem como de metabólitos obtidos destes extratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento e a identificação de substâncias majoritárias presentes nos extratos brutos de *R. petasites* e *V. polyanthes*;
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos por meio de análises em CLAE-DAD;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* dos extratos e de compostos obtidos frente ao parasita *S. mansoni*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

Os ensaios apresentados nesse trabalho foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e no Núcleo de Pesquisa em doenças negligenciadas da Universidade de Guarulhos (UNG). Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- NIPPAN:

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;
- Bomba a vácuo: marca Prismatec, modelo 132;
- Rotaevaporador: marca Buchi, modelo RII;
- Bomba a vácuo: marca Buchi, modelo V-700;
- Banho ultratermostático: marca Cientec, modelo CT-281-28;
- Estufa com circulação e renovação de ar: marca Solab, modelo SL102;
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta: marca Boitton;

- CentralBio:

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) de bomba binária: marca Waters, modelo 1525; injetor automático: marca Waters, modelo 2707; Detector de arranjos de diodos (DAD): marca Waters, modelo 2998.

3.2. MATERIAIS UTILIZADOS

Foram utilizados solventes grau PA das marcas Neon e Vetec. Já para as análises cromatográficas em CLAE foi utilizada água ultrapurificada, obtida no laboratório CentralBio e acetonitrila e metanol grau CLAE da marca J. T. Baker.

Além disso, utilizou-se cromatoplaca de sílica gel 60 GF_{254} (Merck) para realização da cromatografia em camada delgada (CCD). Para revelação foi empregada a radiação ultravioleta (UV) em 254 nm e solução reveladora de anisaldeído/ácido sulfúrico.

Em relação aos métodos de separação em cromatografia por exclusão de tamanho foram utilizados Sephadex® LH20 (Ge Healthcare) em uma coluna de 30 cm de altura com 2,5 cm de diâmetro. Já a separação em coluna clássica empregou-se sílica gel 60 Å; 70-230 mesh da marca Sigma Aldrich em uma coluna com 60 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e outra coluna com 55 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro.

A separação em coluna tipo CLV (Cromatografia Líquida de Baixa Pressão) empregou-se como adsorvente uma mistura de 200 g sílica gel 60 Å; 70 – 230 mesh e 100 g de sílica gel 40 – 63 mesh, ambas da marca Sigma Aldrich, em uma coluna de 10 cm de diâmetro. Já para o isolamento em coluna clássica foi empregado 320 g de sílica gel – partículas de 40 – 63 mesh, como adsorvente em uma coluna com 55 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro.

Para CLAE utilizou-se coluna analítica de fase reversa (Sun Fire C_{18}; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de pré-coluna (Sun Fire C18; 4,6 x 20 mm; 5 µm).

3.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *Renealmia petasites*

Os rizomas de *Renealmia petasites* Ganep (Figura 5) foram coletados no bairro Granjas Triunfo, 43.3176° de latitude sul e 21.6859° de longitude oeste, no município de Juiz de Fora - Minas Gerais. A espécie vegetal foi identificada no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora e possui exsicata depositada no Herbário Leopoldo Krieger da mesma instituição com o registro CESJ 70208.

Figura 5 – Espécie *Renealmia petasites* Ganep no local de coleta.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

3.4. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *Vernonia polyanthes*

As folhas e flores de *Vernonia polyanthes* (Figura 6) foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, 21° 46’ de latitude sul e 43°22’ de longitude oeste, no dia 08 de agosto de 2023. A espécie vegetal foi previamente identificada pela Drª Fátima Regina Gonçalves Salimena, com exsicata depositada no Herbário Leopoldo Krieger da mesma instituição com o registro CESJ 10.329.

Figura 6 – Espécie *Vernonia polyanthes* no local de coleta.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Renealmia petasites* Gagnep

Após a limpeza com água corrente e remoção de materiais estranhos, os rizomas (Figura 7) foram divididos em dois grupos para a realização das extrações por maceração hidroalcóolica à temperatura ambiente. Uma parte (4,5 kg de rizomas) foi triturada em moinho de facas e, em seguida, o material obtido foi submetido ao processo de maceração, em temperatura ambiente, utilizando etanol como líquido extrator para a obtenção do extrato bruto fresco (RPF) (Figura 8). Além disso, cerca de 500 g dos rizomas foram triturados e levados a estufa, à temperatura de 40°C, para secagem por 4 dias. O pó seco obtido foi submetido ao processo de maceração (Figura 8), em temperatura ambiente, utilizando etanol como líquido extrator para a obtenção do extrato bruto seco (RPS). Para a produção de ambos os extratos, as soluções etanólicas obtidas foram filtradas em papel de filtros e, em seguida, transferidas para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40°C (Figura 9).

Os extratos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados fornecendo 73,6 g do extrato RPF e 5,3 g do extrato RPS dos rizomas de *R. petasites*.

Figura 7 – Rizomas higienizados de *R. petasites.*



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 8 – Maceração dos rizomas de *R. petasites.*



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 9 – Rotaevaporação do extrato bruto.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

3.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Vernonia polyanthes*

Para obtenção do extrato bruto seguiu-se a metodologia previamente descrita pelo nosso grupo de pesquisa NIPPAN (Santana *et al*., 2023). Nesse contexto, após a coleta, foram removidos mecanicamente as folhas deterioradas e obtidos 2,0 kg de material íntegro. Em pequenas quantidades, o material vegetal foi transferido para um frasco de vidro e lavado com diclorometano por agitação manual durante 30 segundos em cabine de segurança. Posteriormente, as soluções diclorometânicas obtidas foram filtradas em papel de filtro e concentradas em rotaevaporador à 50°C, obtendo-se cerca de 11,4 g de resíduo bruto denominado VPL (Figura 10).

Figura 10 – Processo de obtenção de VPL.



Legenda: Em A) partes aéreas coletadas de *V. polyanthes*. B) Lavagem foliar do material coletado. C) Extrato bruto foliar obtido.

Fonte: Elaborado pela autora 2023.

3.7. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO RPF

Considerando que o extrato dos rizomas frescos de *Renealmia petasites* (RPF) foi ativo *in vitro* frente a parasitas adultos de *S. mansoni*, esse foi particionado e fracionado na tentativa de isolar e purificar as substâncias responsáveis pela atividade esquistossomicida.

Assim, primeiramente, o extrato bruto (RPF) foi submetido a partição com solventes com diferentes graus de polaridade.

Em 200 mL de uma mistura hidrometanólica (7:3 v/v) o extrato RPF (40,3 g) foi solubilizado com o auxílio de um banho ultrassônico. A solução foi filtrada e submetida a partição com hexano cinco vezes, previamente saturado com água. Obteve-se duas frações, uma hexânica (RPF 01) no qual adicionou-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção de resíduos de água e que posteriormente fora filtrada e concentrada em rotaevaporador à temperatura de 50ºC ± 5 ºC, obtendo-se ao final 1,0 g.

Já a fração remanescente – aquosa – foi novamente submetida a partição líquido-líquido com diclorometano. Novamente, foram obtidas duas frações: uma orgânica (RPF 02) no qual foi tratada com Na_2SO_4, filtrada e concentrada em rotaevaporador à temperatura de 50ºC ± 5 ºC, com um resíduo final de 2,4 g.

A fase orgânica anterior foi recolhida e passou pelo mesmo processo com o solvente acetado de etila. Ao final, obteve-se uma fração orgânica (RPF 03) com 0,7 g e uma fração aquosa (RPF 04) que também fora concentrada em rotaevaporador com massa de 25,3 g.

O perfil cromatográfico, de todas as frações obtidas, foi comparado com os extratos RPF e RPS por CCD, utilizando clorofórmio: metanol (75:25) acidificado com ácido acético glacial (0,1%) como fase móvel.

3.7.1. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 01 por cromatografia em coluna

Em uma coluna clássica com 15,5 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro empacotada com uma mistura de sílica gel 40-63 mesh (300 g) e 63-200 mesh (100 g), cerca de 0,8 g da fração RPF 01 foram submetidos à coluna com objetivo de isolar compostos. Utilizou-se como gradiente inicial uma mistura de hexano: acetato (9:1 v/v) acidificado com ácido acético glacial e durante a eluição da coluna houve o aumento da polaridade e alteração da mistura, onde ao final a fase móvel foi constituída de diclorometano: metanol (7:3 v/v).

3.7.2. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 02 por cromatografia em coluna

Cerca de 2,0 g de RPF 02 foram aplicados em uma coluna de 30 cm de altura e 10,5 cm de diâmetro empacotada com uma mistura de sílica gel 40-63 mesh (300 g) e 63 –a 200 mesh (100 g). Como gradiente inicial foi utilizado uma mistura de hexano: acetato (9:1 v/v) acidificado com ácido acético glacial e durante a eluição da coluna houve o aumento da polaridade e alteração da mistura, onde ao final a fase móvel foi constituída de diclorometano: metanol (7:3 v/v).

3.7.3. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 03 por cromatografia em coluna

Com o objetivo de isolar compostos, a amostra RPF 03 também foi submetida a cromatografia em coluna. Dessa forma, utilizou-se cerca de 0,6 g de amostra em uma coluna de 55 cm de altura e 3 cm de diâmetro empacotada com Sílica gel 60 Å, 70 - 230 mesh; 60 – 230 µm (269 g). O gradiente inicial foi preparado com uma mistura de clorofórmio: metanol (9:1 v/v) acidificado com ácido acético glacial e durante a eluição da coluna houve o aumento da polaridade da mistura do gradiente alcançando ao final a proporção de clorofórmio: metanol (1:1 v/v).

3.7.4. Fracionamento cromatográfico das subfrações RPF 367 por cromatografia em coluna

A partir da avaliação do perfil cromatográfico em CDD, as amostras RPF 3.6 e RPF 3.7 foram unificadas gerando uma nova codificação – RPF 367, e submetida ao fracionamento em coluna clássica. Nesse sentido, 0,1 g de amostra foram aplicadas

em uma coluna de 30 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empacotada com cerca de 23,0 g de silica gel 60 Å, 70 -230 mesh; 60 – 230 µm. Como gradiente inicial utilizou-se uma mistura de clorofórmio: metanol (65:35 v/v) acidificado com ácido acético glacial.

3.7.5. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 04 por cromatografia de exclusão

A partir dos resultados da CCD, a fração RPF 04 foi escolhida para o fracionamento por exclusão de tamanho. A partir da solubilização de cerca de 2,3 g de amostra em uma proporção de metanol: água purificada (7:3 v/v), essa foi submetida a uma coluna de 30 cm de altura com 2,5 cm de diâmetro empacotada com Sephadex LH20.

A fase móvel seguiu a mesma composição e proporção do diluente. Ao final foram coletadas 28 subfrações que foram acompanhadas por CCD tendo como fase móvel: diclorometano:metanol:água – 65:33:2; acidificada com ácido acético glacial (0,1%) e revelada com solução anisaldeído sulfúrico.

3.7.6. Fracionamento cromatográfico da fração RPF 04 por cromatografia em coluna

Além do fracionamento por cromatografia por exclusão, a amostra RPF 04 também foi submetida a cromatografia em coluna. Dessa forma, utilizou-se 3,2 g de amostra em uma coluna de 60 cm de altura por 5 cm de diâmetro, empacotada com cerca de 270,0 g de sílica gel 60 Å, 70 -230 mesh; 60 – 230 µm.

O gradiente inicial utilizou uma mistura de diclorometano: metanol: água – acidificada com ácido acético glacial na proporção 80:18:2 (v/v/v). Posteriormente aumentou-se a polaridade do solvente até atingir a concentração de diclorometano: água 1:1.

Ao final foram coletados 48 tubos (com volume de coleta de 70 mL) sendo todos acompanhados e analisados por CCD – tendo como fase móvel: DCM:MeOH:H_2O H^+ (65:33:2 v/v) e sendo utilizado como solução reveladora anisaldeído sulfúrico.

3.8. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Vernonia polyanthes* (VPL) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA À VÁCUO (CLV):

Cerca de 11,4 g do extrato VLP foi submetido à cromatografia líquida à vácuo. Nesse contexto, foi utilizado uma mistura de fase móvel hexano: acetato de etila em grau crescente de polaridade (Figura 11).

Figura 11 – Fracionamento por CLV do extrato VPL.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Foi realizada uma análise comparativa por CCD entre o extrato obtido e o padrão de lactona sesquiterpênica isolado previamente pelo grupo Nippan (Santana *et al*., 2023), utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1 v/v) e revelado com solução de anisaldeído sulfúrico.

3.8.1. Fracionamento cromatográfico de VPL - 5 por cromatografia em coluna clássica

De acordo com os resultados obtidos por CCD e análise comparativa com o padrão de glaucolido A, a amostra VPL 5 foi escolhida para o fracionamento em coluna clássica. Dessa forma, utilizou-se cerca de 2,8 g de amostra em uma coluna com 3 cm de diâmetro empacotada com Sílica gel 60 Å, 63 – 200 µm (100 g). O gradiente inicial foi preparado com uma mistura de hexano: acetato de etila (9:1 v/v) acidificado

com ácido acético glacial e durante a eluição da coluna houve o aumento da polaridade da mistura do gradiente alcançando ao final a proporção de 100% de acetato de etila.

3.8.2. Recristalização de VPL 40 – 60

Considerando a análise em CCD, a qual apresentava uma substância com Rf semelhante ao padrão de Glaucolido A, essa fração foi submetida ao processo de recristalização. Em balão de fundo redondo, a amostra foi solubilizada em acetato de etila e, logo após, hexano. À medida que a solução apresentava aspecto turvo, essa era aquecida à temperatura de 45°C para que a mesma fosse solubilizada novamente. O processo foi repetido até o momento em que a solução se encontrava completamente saturada mesmo com aquecimento. A solução foi deixada em repouso por 24 horas, no qual foi possível observar a formação de cristais, denominados e codificados como GLDA. Esses cristais foram removidos manualmente e acondicionados em um frasco adequado para a eliminação completa do solvente.

3.9. ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE-DAD

Os extratos brutos, bem como as frações, foram analisados em CLAE-DAD. O extrato RPS e as frações RPF 01, RPF 1.1 e RPF 02 foram solubilizadas em metanol UV-HPLC e o extrato RPF e as frações RPF 03, RPF 367.3, RPF 04, RPF 4.4 em uma mistura de metanol UV-HPLC: água ultrapurificada (1:1). Todas as amostras foram submetidas a banho ultrassônico por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram diluídas na proporção 9:1 (metanol UV-HPLC: água ultrapurificada), centrifugadas por 5 minutos a 10.000 RPM e filtrada em unidade filtrante de 0,45 µm com a concentração final de 2,0 mg/mL.

Já o extrato bruto (VPL) bem como a fração VPL 5, a subfração VPL 40-60 e o cristal GLDA obtidos foram solubilizadas em metanol UV-HPLC. Posteriormente foram submetidas em banho ultrassônico por 10 minutos e diluídas na proporção 9:1 (metanol UV-HPLC: água ultrapurificada), centrifugadas por 5 minutos a 10.000 RPM e filtradas em unidade filtrante de 0,45 µm obtendo-se uma concentração final de 2,0 mg/mL de cada amostra.

Como condições cromatográficas para análise em CLAE-DAD, para ambas as espécies vegetais, utilizou-se coluna analítica em fase reversa C_{18} (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), com pré-coluna C_{18} (4,6 x 20 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta de água

ultrapurificada acidificada com ácido acético glacial (0,1%) – fase móvel A e, como fase móvel B metanol HPLC - UV. O fluxo foi estabelecido em 1,0 mL/min à temperatura de 40°C com volume de injeção de 50 µL. O gradiente de eluição está descrito na Tabela 1. Além disso, para avaliação, utilizou-se o *software* Empower 3 sendo selecionados os comprimentos de onda de 230 nm e 280 nm para as amostras obtidas de *R. petasites* e 230 nm para as amostras provenientes de *V. polyanthes*.

Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado para análise das amostras por CLAE-DAD.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
Inicial	60	40
45	0	100
46	0	100
60	60	40

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.10. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA GLDA.

A substância GLDA foi submetida à análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C, no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFJF. A substância isolada foi preparada a partir da solubilização em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, Cambridge Isotope Laboratories) e analisada em espectrômetro BRUKER AscendTM 500 operado em 500 MHz (RMN de ^{1}H) e 125 MHz (RMN de ^{13}C) com software TopSpin 3.2. Os espectros obtidos foram comparados com os existentes na literatura.

3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes técnicas da ARRIVE bem como com as leis nacionais de Diretrizes para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório – Lei 11.790/2008. Nesse sentido foi aprovado o protocolo experimental CEUA 031/2017 e CEUA 007/2018 foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Guarulhos – Guarulhos, SP.

3.11.1. Parasitas, hospedeiros e manutenção do ciclo de *S. mansoni*

Utilizou-se nesse trabalho a linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 BH (Belo Horizonte, MG), armazenado no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP. Como hospedeiro intermediário foram utilizados os caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (De Moraes *et al*., 2014; Carvalho *et al*., 2015).

Para manutenção do ciclo, camundongos Swiss fêmeas, com aproximadamente 20 g e 3 semanas de idade, foram adquiridas de Animais para Laboratório, Paulínea, São Paulo (Silva *et al*., 2017).

Os camundongos foram infectados com 120 cercárias e mantidos sob condições controladas de temperatura, aproximadamente 24°C, ciclos de luminosidade 12 horas e com acesso livre a água e comida. Após 49 dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e perfundidos (os animais foram seccionados longitudinalmente na região ventral) com meio RPMI 1640 (Roswell Memorial Park Institute, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) com L-glutamina, vermelho de fenol e heparina sódica 5 UI/mL (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), através do sistema porta hepático para a recuperação dos vermes adultos de S. *mansoni* (De Moraes *et al*., 2014; Carvalho *et al*., 2015).

3.11.2. Ensaios *in vitro* com vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Primeiramente, os vermes adultos foram lavados com meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 UI/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e estreptomicina 200 µg/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), em placa de Petri de polietileno estéril (90 mm x 15 mm). Posteriormente, os parasitas foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo 2 casais por poço em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich) (Pereira *et al*., 2021; Carvalho *et al*., 2021).

Em seguida as amostras foram preparadas em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO Merck) nas concentrações de 50 µg/mL a 200 µg/mL. O praziquantel (PZQ) foi utilizado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Os parasitas foram incubados em estufa (Thermo Scientific 8000 WJ, CA, EUA) a 37º C e atmosfera de CO_2 a 5% (Silva *et al*., 2017). O experimento foi realizado em triplicata.

O monitoramento foi realizado por até 72 horas, diariamente, com auxílio de estereomicroscópio. A mortalidade dos parasitas foi avaliada pela ausência de movimentos por 2 minutos ou por toque com pinça. Além disso, também foi avaliada a redução da atividade motora em moderada e significativa (Silva *et al*., 2021b; Xavier *et al*., 2022; Brito *et al*., 2022; Pereira *et al*., 2021).

3.12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Para avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas suíços infectados por via percutânea com aproximadamente 80 cercárias de *S. mansoni*. Os tratamentos ocorreram 49 dias após a infecção (fase adulta do verme, infecção patente). Os animais, distribuídos aleatoriamente em grupos de cinco camundongos foram tratados oralmente por gavagem com uma única dose de cada amostra dissolvida em 2% de etanol em solução salina. Os camundongos infectados foram tratados com o veículo (2% de etanol em solução salina), e utilizados como grupo de controle, enquanto o PZQ foi administrado oralmente (400 mg/kg) e serviu como fármaco de referência (Queiroz *et al*., 2021; Pereira *et al*., 2021; Silva *et al*., 2017; Ferreira *et al*., 2022; Lago *et al*., 2018).

Aos 63 dias pós-infecção, os camundongos foram eutanasiados (através do método de CO_2) e os parasitos foram contados e sexados para mensurar a redução da carga de vermes. A eficácia terapêutica das amostras em modelos murinos de esquistossomose também foi avaliada por meio de exames quantitativos (método de Kato-Katz) e qualitativos (padrão de oograma) dos ovos fecais. As porcentagens de redução da carga de vermes e redução da carga de ovos foram calculadas conforme descrito anteriormente (Brito *et al*., 2022; Silva *et al*., 2021a; Mengarda *et al*., 2021; Carvalho *et al*., 2022; Queiroz *et al*., 2021; Lago *et al*., 2018).

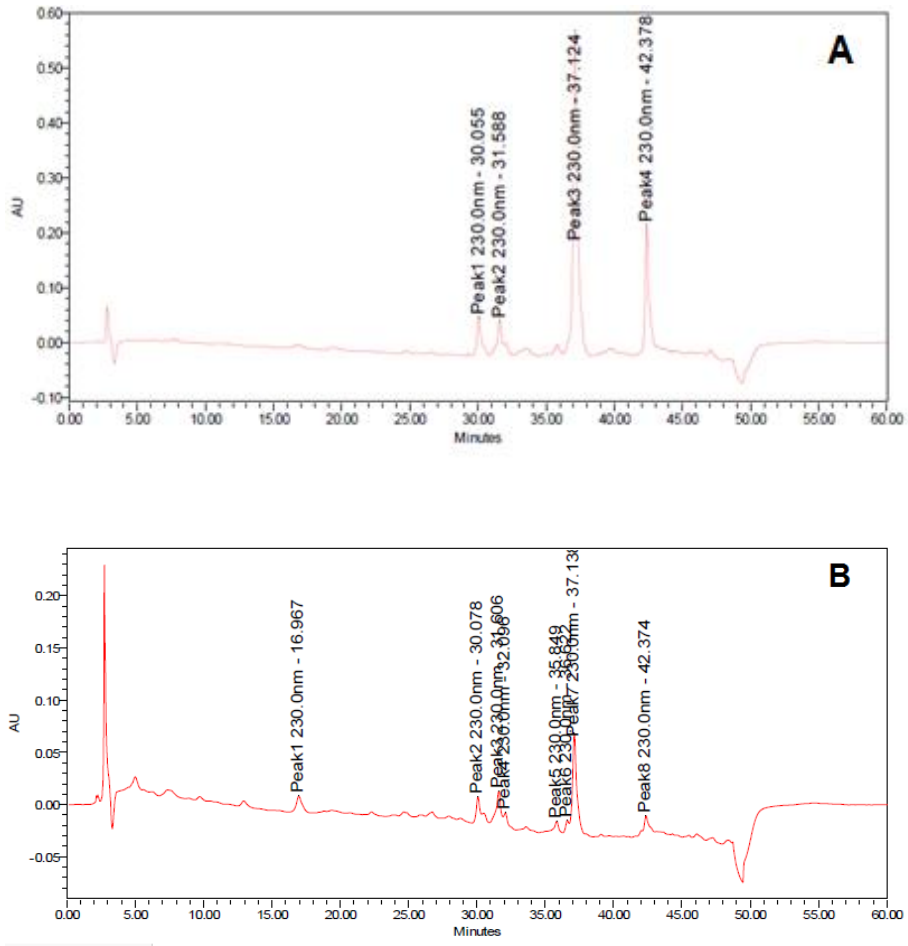
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE A ESPÉCIE VEGETAL *R. petasites*

4.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS POR CLAE-DAD

Os extratos secos (RPS) e frescos (RPF) foram avaliados em CLAE-DAD nos comprimentos de onda de 230 nm e 280 nm (Figuras 12 e 13). É possível verificar que há diferença nos perfis cromatográficos entre RPS e RPF.

Avaliado a 280 nm, o RPS apresenta um pico com tempo de retenção de aproximadamente 37 minutos que está ausente em RPF. Além disso, RPF apresenta um pico em aproximadamente 2 minutos ausente em RPS.

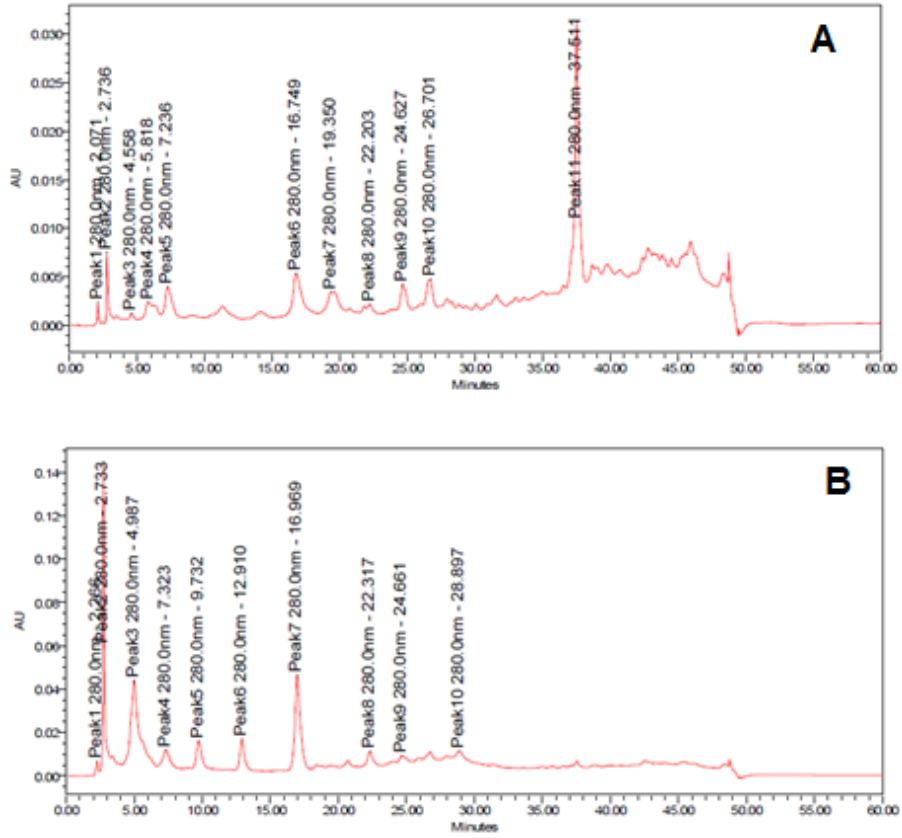
Figura 12 – Cromatogramas de RPS e RPF, respectivamente, por CLAE-DAD avaliados em 230 nm.



Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 230 nm. Em A) Cromatograma de RPS e em B) Cromatograma de RPF.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 13 – Comparação entre os cromatogramas de RPS e RPF, respectivamente, por CLAE-DAD – avaliados em 280 nm.

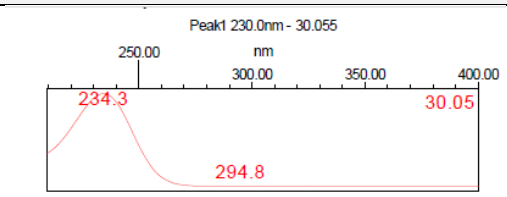
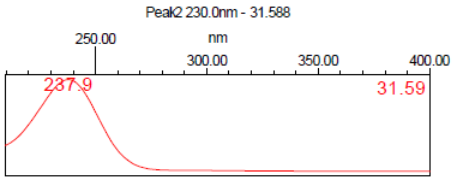
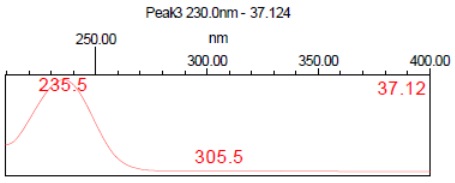
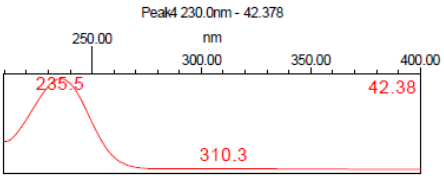


Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 280 nm. Em A) Cromatograma de RPS e em B) Cromatograma de RPF.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

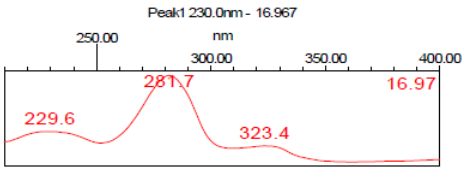
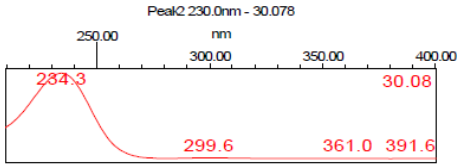
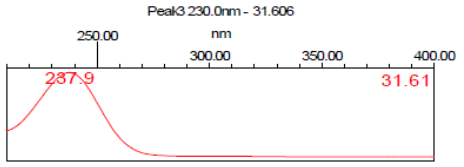
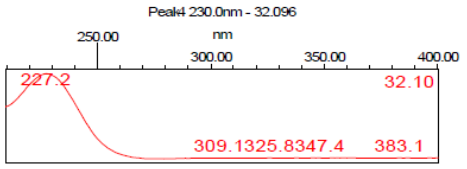
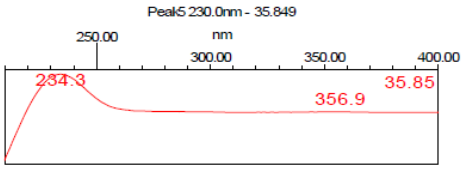
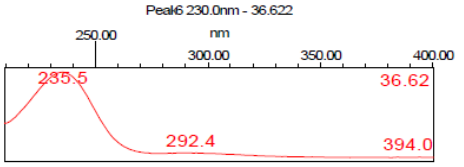
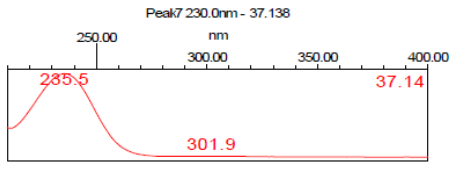
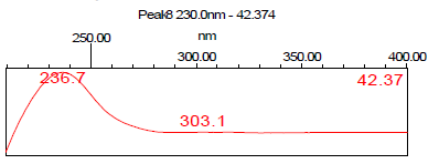
A espectroscopia UV é uma técnica analítica amplamente utilizada para identificar e caracterizar moléculas orgânicas e inorgânicas com base na absorção de luz na região do espectro eletromagnético entre 190 e 400 nanômetros (Rocha *et al*., 2018). Nas tabelas 2, 3, 4 e 5 estão dispostos os espectros UV das principais substâncias encontradas em cada extrato.

Tabela 2 – Perfil cromatográfico dos picos observados em RPS em 230 nm.

Pico	Tempo de retenção (min)	Espectro UV
1	30,055	
2	31,566	
3	37,124	
4	42,378	

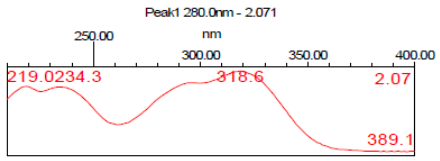
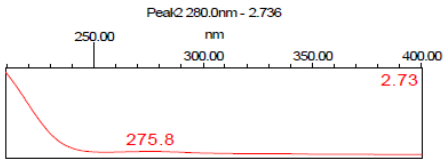
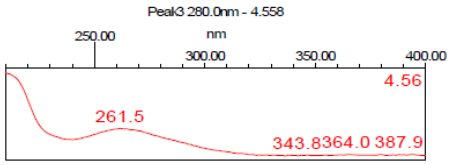
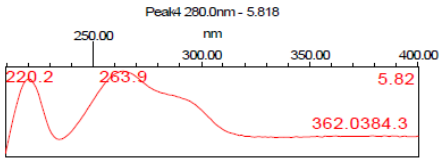
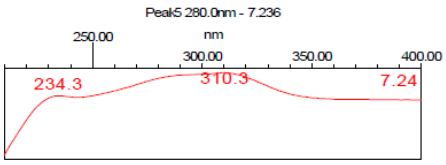
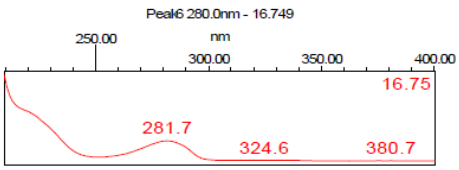
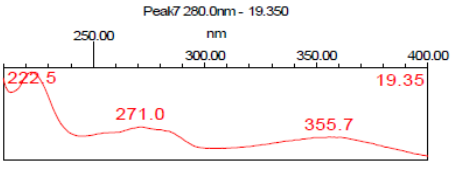
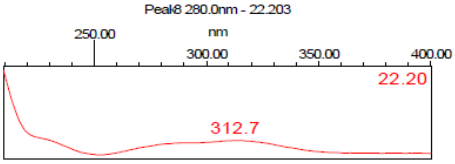
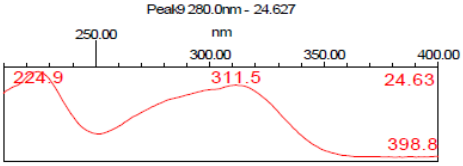
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

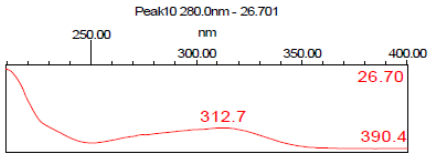
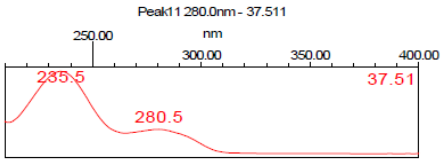
Tabela 3 – Perfil espectroscópico dos picos observados em RPF em 230 nm.

Pico	Tempo de retenção (min)	Espectro UV
1	16,967	
2	30,078	
3	31,606	
4	32,096	
5	35,849	
6	36,622	
7	37,138	
8	42,374	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

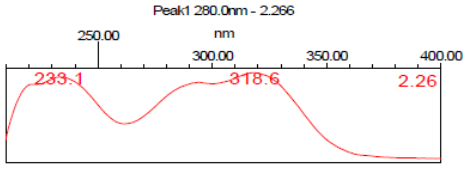
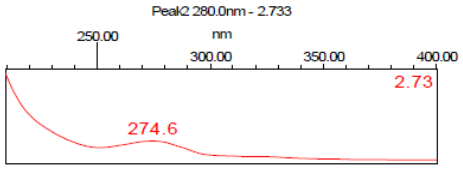
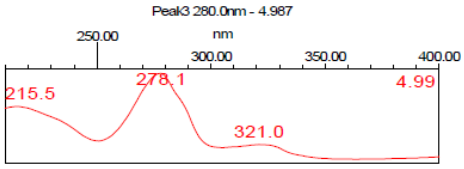
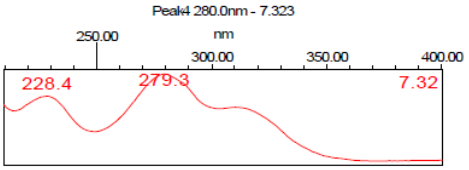
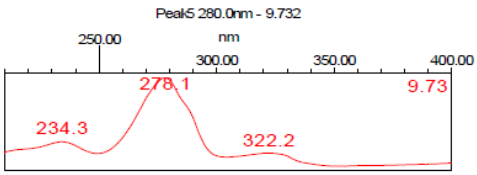
Tabela 4 – Perfil espectroscópico dos picos observados em RPS em 280 nm.

Pico	Tempo de retenção (min)	Espectro UV
1	2,071	
2	2,736	
3	4,558	
4	5,818	
5	7,236	
6	16,749	
7	19,350	
8	22,203	
9	24,627	

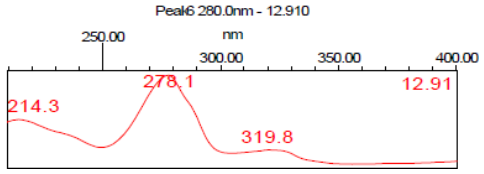
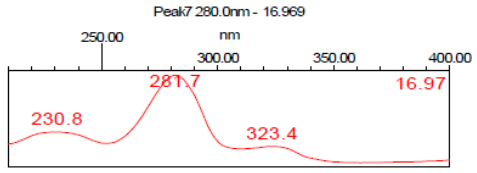
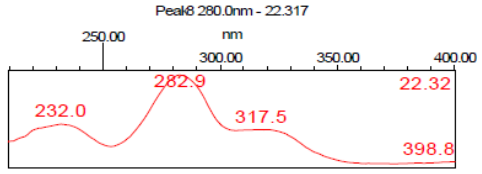
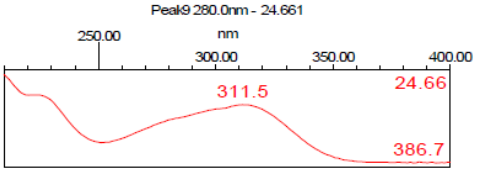
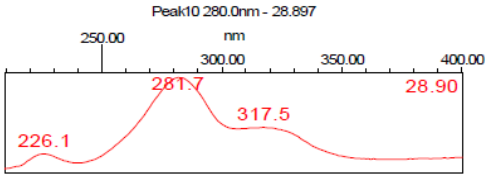
Continuação da Tabela 4		
10	26,701	
11	37,511	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 5 – Perfil espectroscópico dos picos observados em RPF em 280 nm.

Pico	Tempo de retenção (min)	Espectro UV
1	2,266	
2	2,733	
3	4,987	
4	7,323	
5	9,732	

Continuação da Tabela 5

6	12,910	
7	16,969	
8	22,317	
9	24,661	
10	28,897	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As moléculas orgânicas possuem padrões de absorção de UV específicos devido à estrutura eletrônica única de seus grupos funcionais. Ao comparar os espectros de uma substância desconhecida com os espectros de substâncias conhecidas, é possível fazer correspondências que auxiliam na identificação dessas substâncias ou elucidam a classe de compostos (Passos *et al*., 2020).

Alguns espectros de UV apresentaram máximos de absorção em torno de 280 nm. Alberti *et al*., 2017 descrevem que a classe dos diarilheptanoides exibem absorbância na faixa de 250 a 290 nm.

Tal informação é sugestiva de que algumas das substâncias encontradas em RPS e RPF possam pertencer à classe dos diarilheptanoides, uma vez que dentre os poucos estudos fitoquímicos sobre a espécie. Soares *et al*., 2021 identificaram 8 compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos dos rizomas, folhas e caule de *R.*

petasites dentre os quais 5 diarilheptanoides, 1 flavonoide e 2 álcoois graxos, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Substâncias químicas identificadas em *R. petasites* por Soares *et al*., 2021.

Substância química	Parte da planta		
	Rizomas	**Caule**	**Folhas**
1,7-bis(3,4-dihidroxifenill)-6-hydroxiheptan-3-ona	+	-	+
3-Heptanona, 7-(3,4-dihidroxifenill)-5-hidroxi-1-(4- hidroxifenil)-	+	-	+
Hirsutanona	+	+	+
(E)-1-(3,4-dihidroxifenil)-7-(4-hidroxifenill)hept-4-en-3-ona	+	+	+
[5-Acetiloxi-1,7-bis(3,4-dihidroxifenil)heptan-3-yl] acetato	+	+	+
5,6,2′-Trimetoxi-flavona	+	+	+
Docosanol	+	+	+
Acetato de avocadina	+	+	+

Fonte: Adaptado de Soares *et al*., 2021.

Também foram observados espectros com máximos de absorção em 280 nm e 325 nm, principalmente em RPF, sendo esses característicos de flavonoides. Assim como Soares *et al*., 2021 que identificou compostos pertencentes a essa classe em *Renealmia petasites*, já foram isoladas algumas flavanonas com interessantes atividades biológicas a partir de outras espécies do gênero, como por exemplo, a pinostrombina isolada a partir das espécies *R. nicalaioides*e *R. alpinia*. Segundo estudos, esta flavanona apresentou atividades anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antiemética e anticonvulsivante (Gómez-Betancur *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2013).

Além disso, picos com tempos de retenção coincidentes tanto para RPS quanto para RPF em 30, 31, 37 e 42 minutos apresentaram máximos de absorção em torno de 235 nm. Dentre as possíveis classes de compostos para estas substâncias, Kang *et al*., 2019 relatam a absorção máxima em espectro de ultravioleta de terpenos em aproximadamente 226 nm à 235 nm.

Dos Santos *et al*., 2021 descreveram o perfil de lipídeos e terpenos presentes no extrato bruto hexânico e no óleo essencial de sementes de *R. petasites,* respectivamente. O ácido oleico foi o mais abundante ácido graxo encontrado, com cerca de 46%, dentre as principais propriedades atribuídas a essa substância é a atividade antimicrobiana devido a longa cadeia carbônica insaturada.

Já a caracterização de terpenos demonstrou o conteúdo de mono, sesqui e diterpenos, no qual as substâncias 2-careno, labdadieno e espatulenol foram as mais abundantes. Já anteriormente descrito em outras espécies da família Zingiberaceae, o 2-careno apresenta elevada atividade citotóxica e a biotransformação do mesmo origina substâncias com atividade antifúngica e antibacteriana (Dos Santos *et al*., 2021; Albaqami *et al*., 2022). O espatulenol, o principal sesquiterpeno encontrado no extrato obtido a partir das sementes de *R. petasites*, também possui atividades antioxidantes, antiproliferativas e antibacterianas (Dos Santos *et al*., 2021).

É importante considerar que, dentre as substâncias descritas para a espécie, não foram encontrados dados na literatura sobre o perfil fitoquímico dos rizomas frescos. Como pode-se observar nos cromatogramas, há diferença no perfil químico dos extratos obtidos de formas distintas e tal diferença provocou impacto na atividade biológica, uma vez que apenas o extrato fresco (RPF) apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Por isso, RPF foi submetido ao fracionamento cromatográfico com o objetivo de isolar e identificar substâncias de interesse e atividade biológica.

4.2. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE RPF

Após a partição do extrato bruto fresco (RPF), o rendimento total das frações obtidas foi de 77,3%. A fração MeOH:H_2O (RPF 04) foi a majoritária, com cerca de 25,3 g (81% do extrato bruto). Na Figura 14 encontra-se o esquema do fracionamento por partição líquido-líquido de RPF bem como as respectivas massas para as frações obtidas.

Figura 14 – Fluxograma da partição líquido-líquido de RPF.



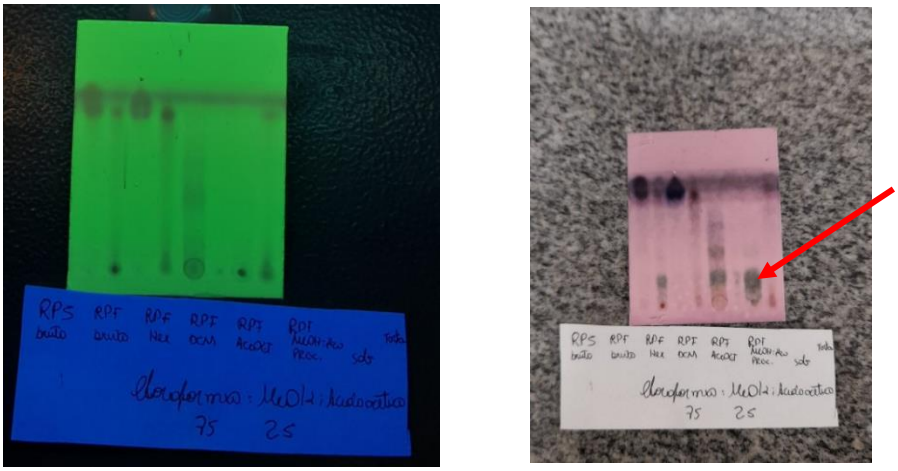
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Devido à ampla faixa de polaridade das frações obtidas não foi possível definir uma única fase móvel para a avaliação conjunta de todas. Contudo, para avaliação conjunta das frações a melhor condição cromatográfica encontrada foi clorofórmio: metanol (75:25).

De acordo com a Figura 15, pode-se verificar que há um componente majoritário em RPF 04, sendo este representado por uma banda de coloração verde, revelada em anisaldeído/ ácido sulfúrico, que também está presente em RPF 03. Além disso, avaliando a região de mesmo RF no UV em 265 nm, as mesmas bandas não são visíveis, sugerindo a ausência de anéis aromáticos na estrutura da substância.

Comparando essas frações com os extratos brutos por CCD (Figura 15) é possível observar que tais bandas não aparecem no extrato bruto seco (RPS), somente no fresco (RPF). Tal fato pode confirmar a diferença química que existe entre os extratos e, consequentemente, a atividade biológica. Além disso, é sugestivo que tal banda seja a substância responsável pela atividade observada.

Figura 15 – Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos e partições de *R. petasites.*



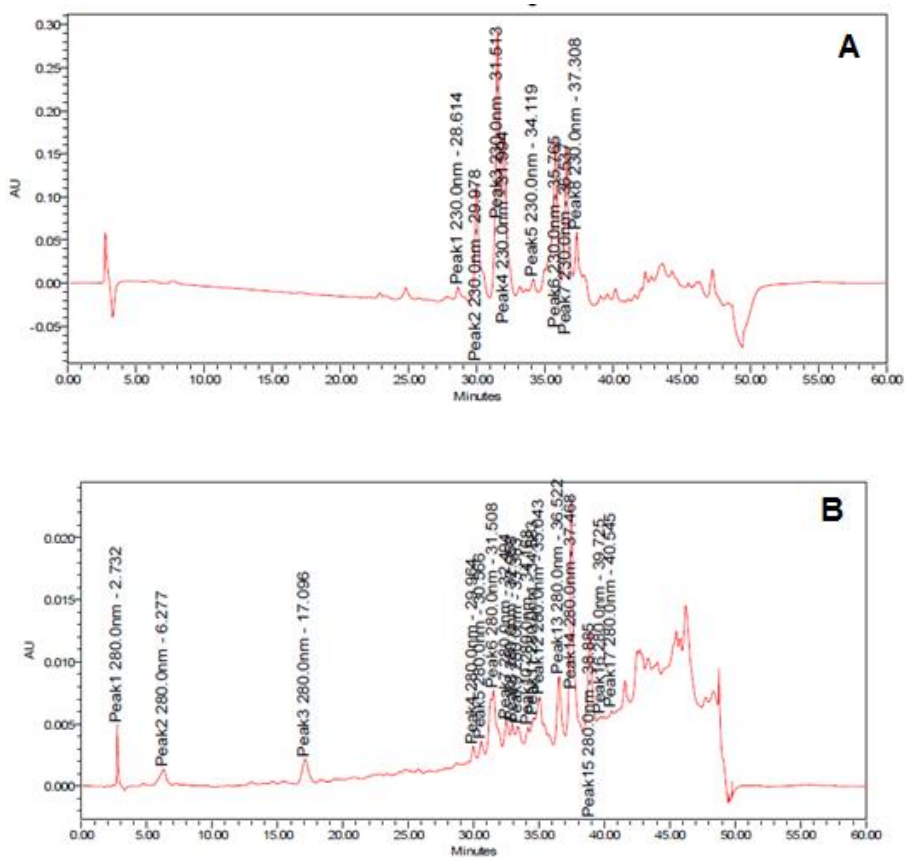
Eluente: clorofórmio: metanol: H^+ (75:25 v/v); Revelador: UV 265 nm e anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 01 E SUBFRAÇÕES

De acordo com os cromatogramas obtidos (Figura 16), a fração RPF 01 possui um pico em torno de 38 minutos (quando avaliada em 280 nm) que está presente somente em RPS. Quando avaliadas em 230 nm, observa-se um pico com tempo de retenção aproximado de 32 minutos que também é possível observar em RPF.

Figura 16 – Cromatogramas de RPF 01 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm, respectivamente.



Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 280 nm. Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

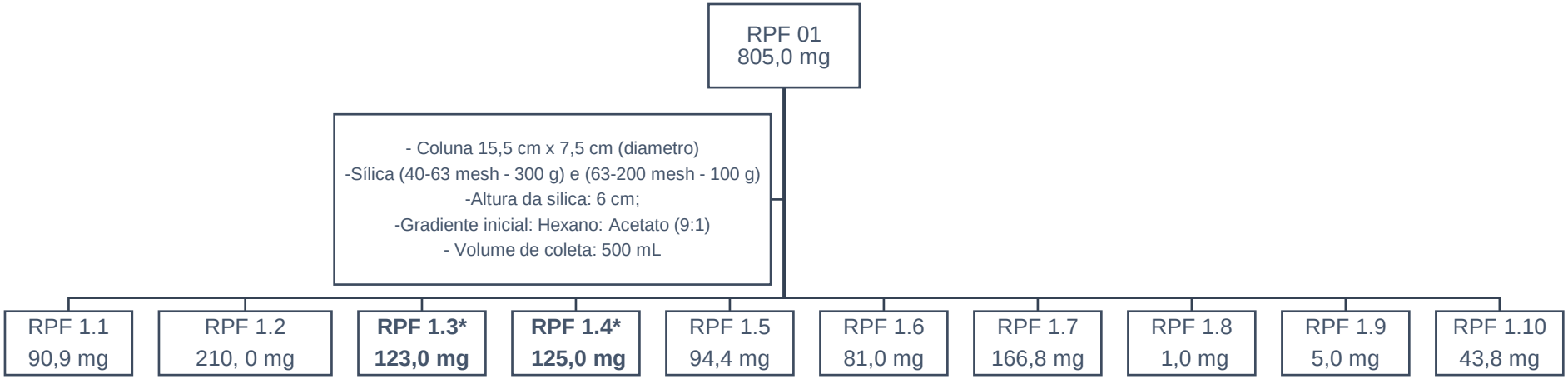
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Com o objetivo de tentar isolar substâncias a partir da fração RPF 01, essa foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna. Ao final do processo, foram obtidas 10 subfrações – RPF 1.1 a RPF 1.10 (Figura 17). Após o processo de eliminação do solvente, as subfrações RPF 1.3 e RPF 1.4 formaram precipitados em seus respectivos frascos (Figura 18). Como pode ser observado na CCD – revelada com anisaldeído, as mesmas apresentam substâncias com RF em torno de 0,5, coloração roxa e que, visualmente, sugerem um elevado grau de pureza (Figura 19).

Apesar de RPF 1.3 sugerir elevado grau de pureza por CCD, ainda assim, de acordo com os cromatogramas obtidos por CLAE a fração está semipurificada (Figura

20). Desta forma, estudos adicionais para a identificação desta substância devem ser realizados.

Figura 17 – Fluxograma do fracionamento por coluna da fração RPF 01.



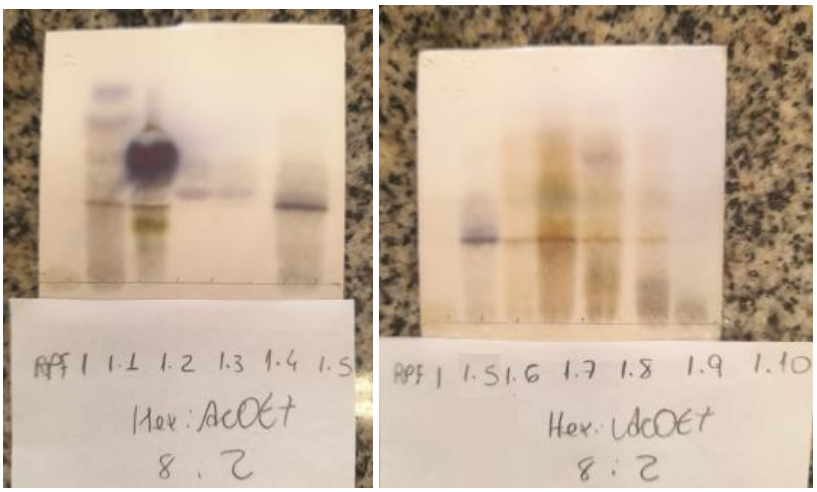
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 18 – Precipitado formado na subfração RPF 1.3.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

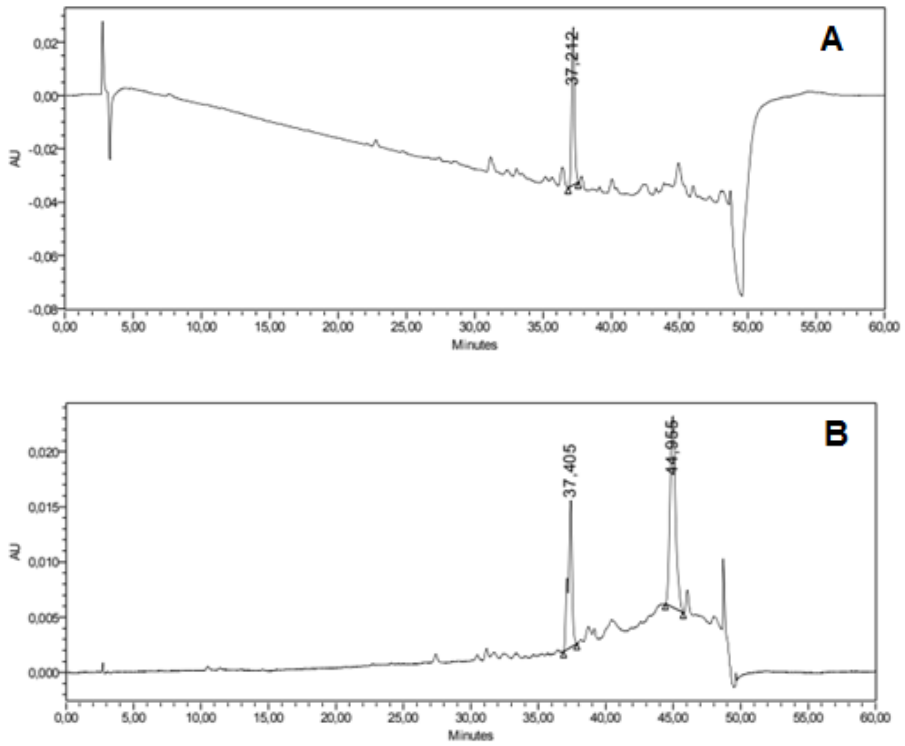
Figura 19 – CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 01.



Eluente: Hexano: acetato de de etila (80: 20 v/v); Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 20 – Cromatogramas de RPF 1.3 - avaliado em 230 nm e 280 nm.



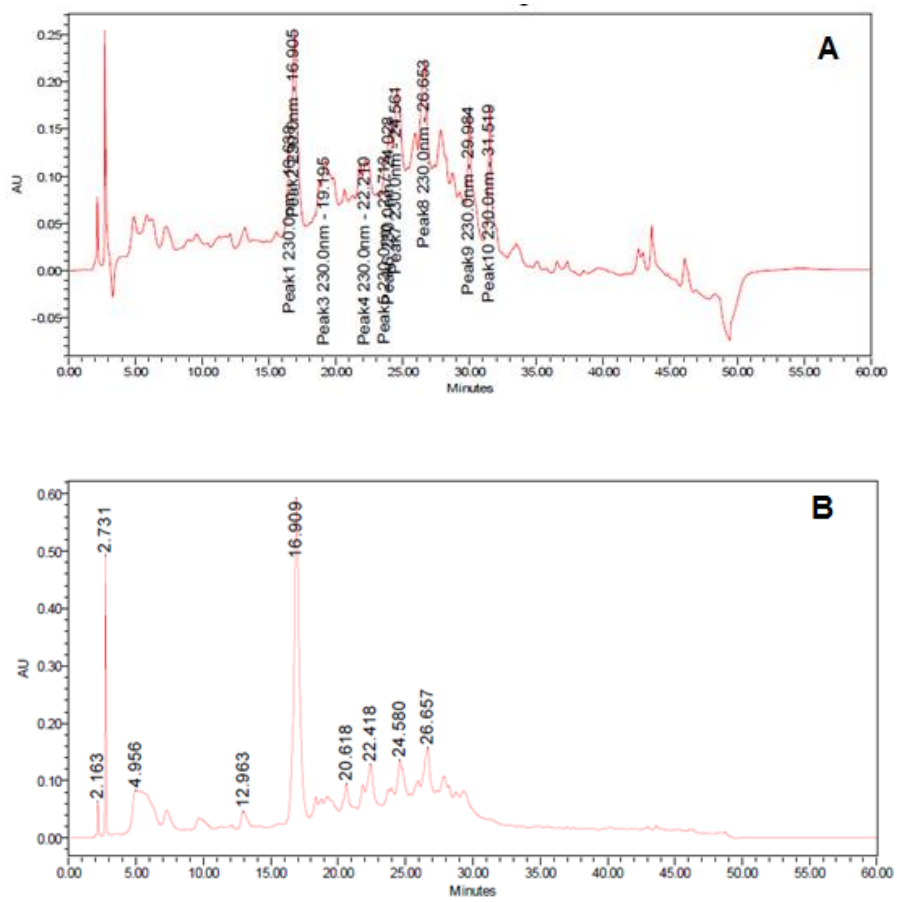
Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 02

Na figura 21 está apresentado o perfil cromatográfico de RPF 02 em 230 nm e 280 nm. Nessa fração o pico majoritário apresenta tempo de retenção de aproximadamente 16 minutos, bem como um pico em torno de 2 minutos.

Figura 21 – Cromatogramas de RPF 02 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.

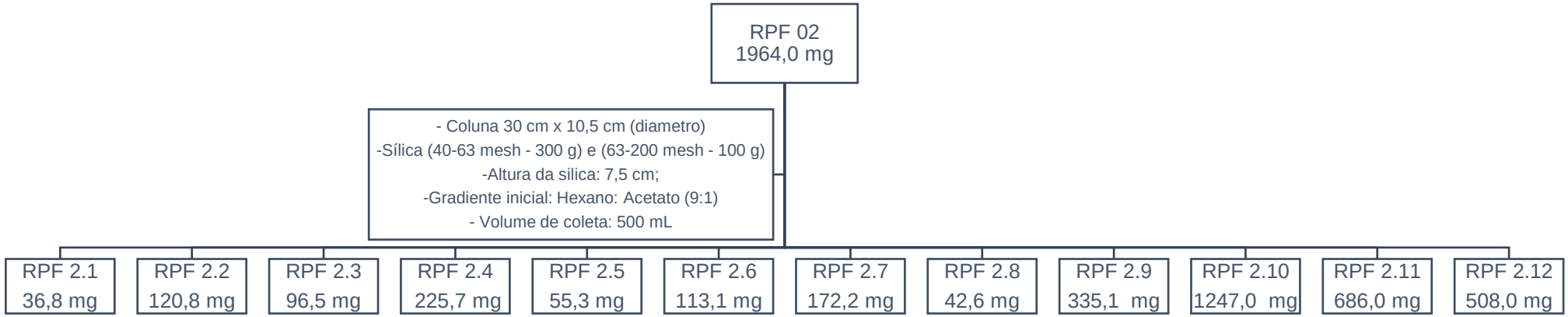


Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

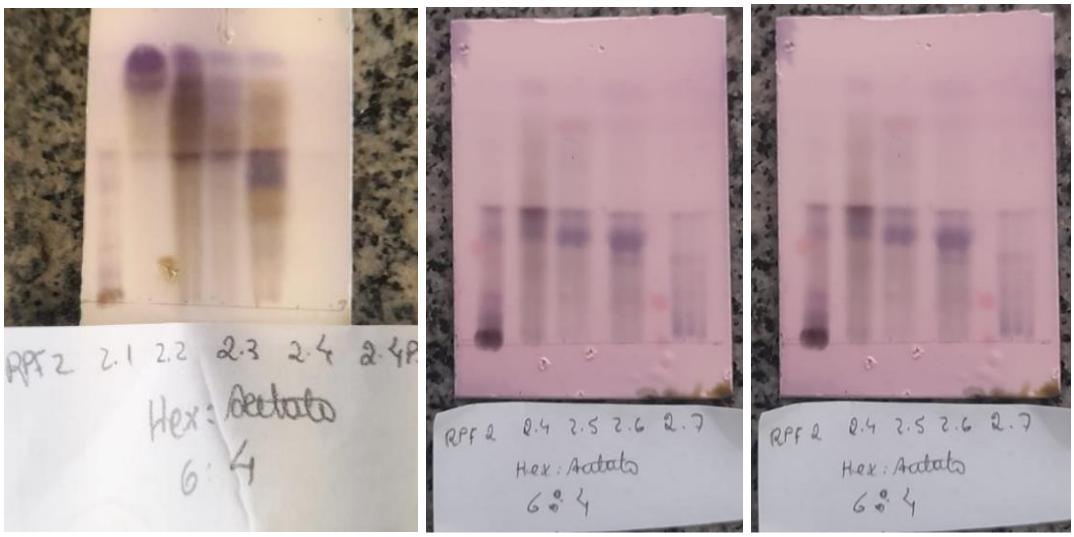
A fração RPF 02 também foi submetida ao fracionamento por coluna clássica, sendo que as 43 subfrações coletadas foram reunidas conforme o perfil cromatográfico. Ao final do processo foram obtidas 12 subfrações, codificadas como RPF 2.1 a RPF 2.12 (Figuras 22 e 23). Todavia, nenhuma substância foi purificada, sendo necessário a realização de outras técnicas de separação para obtenção de substâncias puras dessa fração.

Figura 22 – Fluxograma do fracionamento por coluna da fração RPF 02.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 23 – CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 02



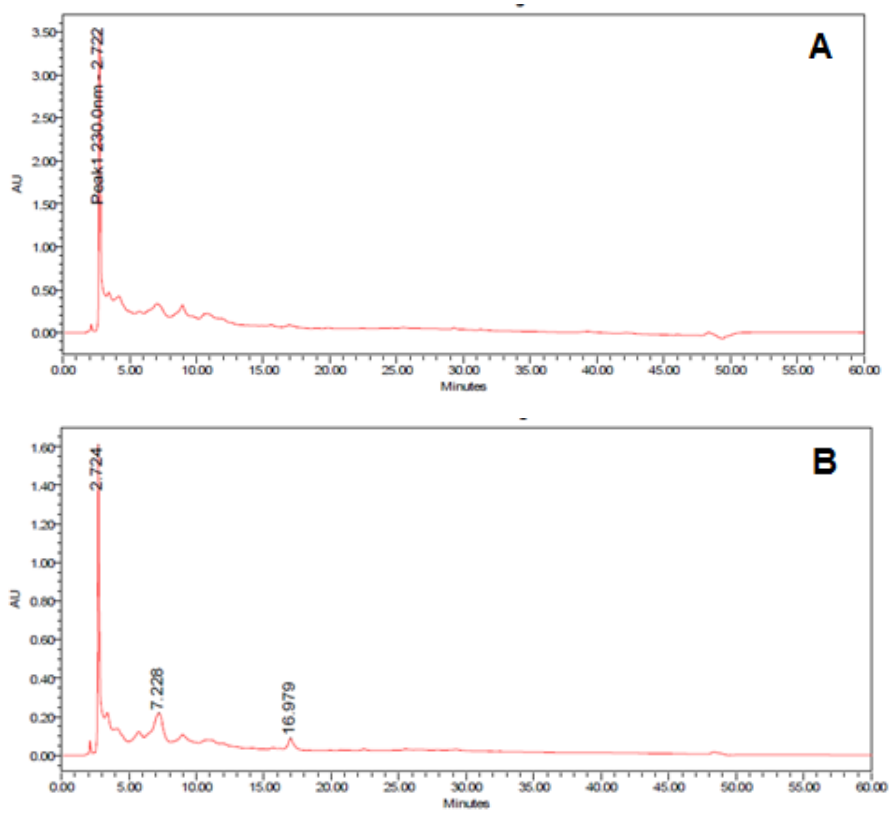
Eluente: hexano: acetato de etila (60: 40 v/v); Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 03 E SUBFRAÇÕES

A fração RPF 03 apresentou substâncias de caráter mais polar, tendo em aproximadamente 2 minutos o pico majoritário em ambos os comprimentos de onda, como pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 – Cromatogramas de RPF 03 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.



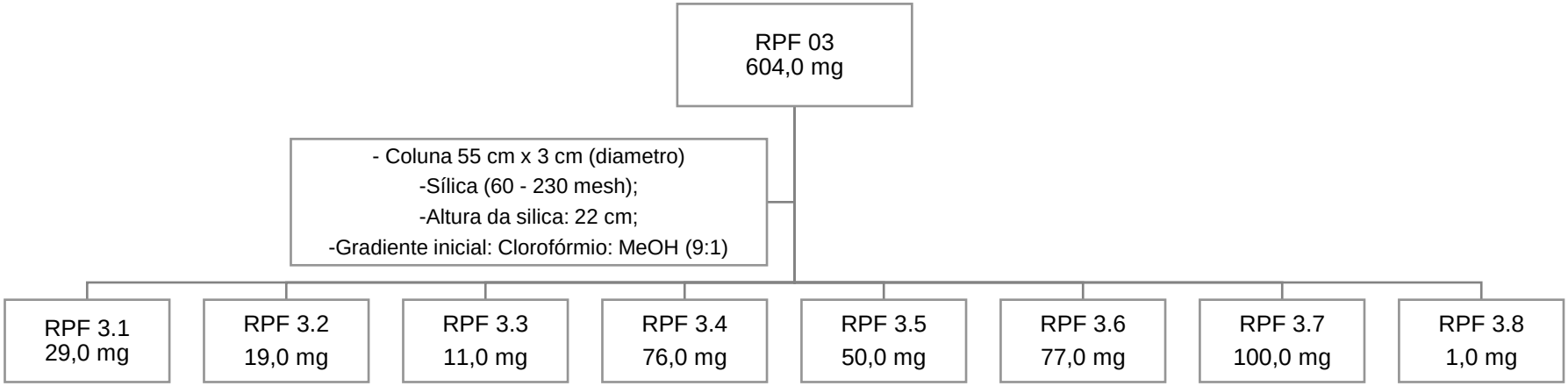
Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Com o intuito de isolar as substâncias presentes, foi realizado o fracionamento da fração RPF 03 por cromatografia em coluna clássica.

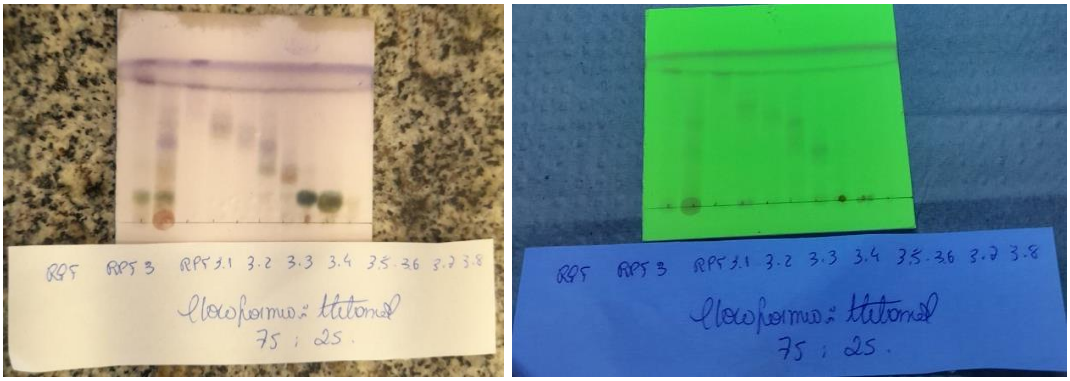
Ao final, foram coletadas 90 subfrações que foram reagrupadas em 8 subfrações – codificadas como RPF 3.1 a RPF 3.8 de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em CCD (Figura 25). As subfrações RPF 3.6 e RPF 3.7 (reunidas como RPF 367), as quais mostraram banda verde de interesse inicial (Figura 26) foram escolhidas para novo fracionamento.

Figura 25 – Fluxograma do fracionamento por coluna de RPF 03.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

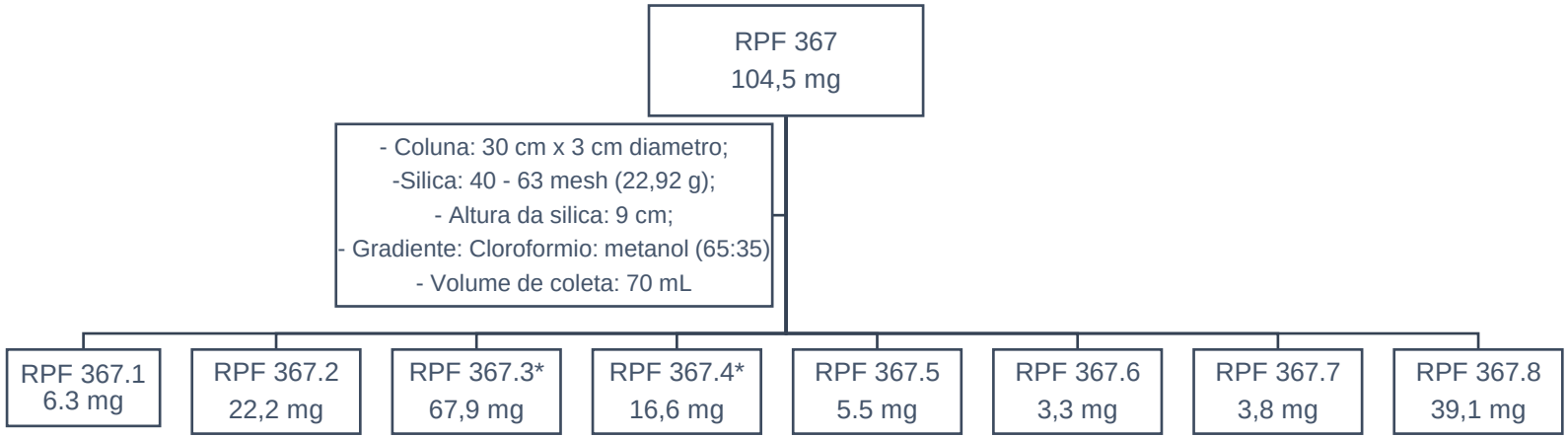
Figura 26 – CCD das frações obtidas a partir de RPF 03.



Eluente: clorofórmio: metanol (75: 25 v/v); Revelador: anisaldeído sulfúrico e luz UV 265 nm.
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

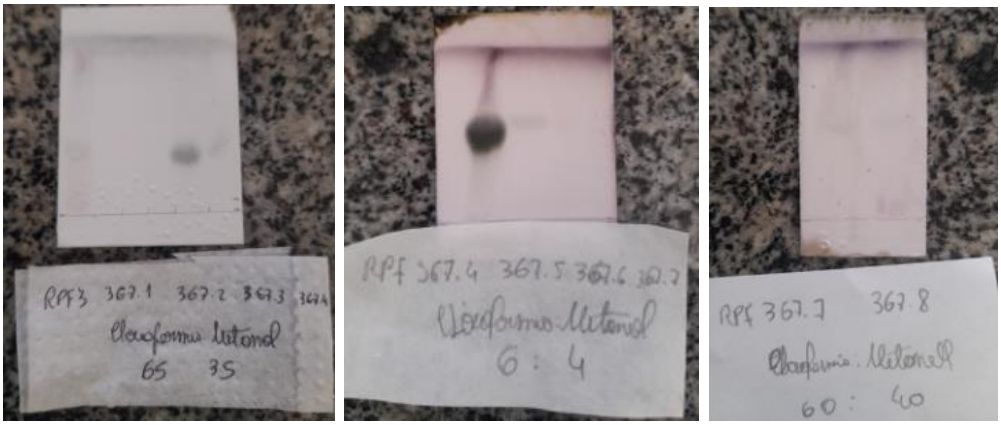
A subfração RPF 367 também foi submetida ao fracionamento por coluna (Figura 27). Após o processo, a substância de interesse, presente nas subfrações RPF 367.3 e 367.4 (Figura 28) ainda não foi completamente isolada, sendo necessário realizar outras técnicas para o isolamento e purificação.

Figura 27 – Fluxograma do fracionamento por coluna da subfração RPF 367.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 28 – CCD das subfrações obtidas a partir de RPF 367.



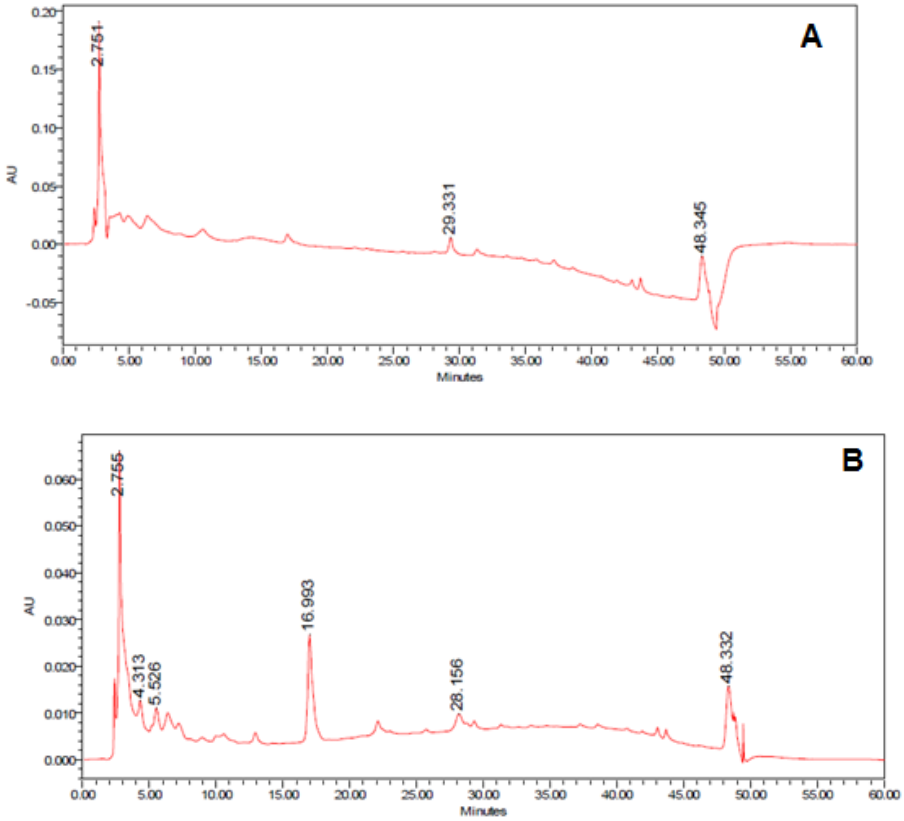
Eluente: clorofórmio: metanol (65: 35 v/v); Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO RPF 04

Na figura 29 estão apresentados os cromatogramas em 230 nm e 280 nm da fração RPF 04. Em 280 nm, o cromatograma apresenta dois picos majoritários (2,8 min e 17,0 min). Já em 230 nm, a fração RPF 04 apresenta um pico majoritário em aproximadamente 2,8 minutos, semelhante ao encontrado nas amostras RPF 02 e RPF 03.

Figura 29 – Cromatograma de RPF 04 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.



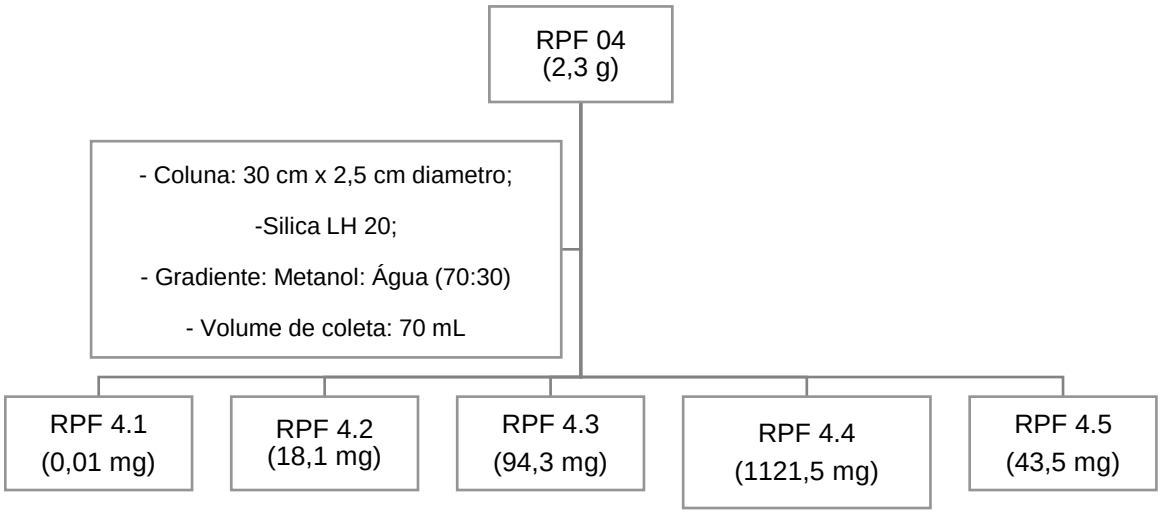
Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Considerando os resultados obtidos em CCD e a natureza mais polar da fração RPF 04, optou-se por utilizar a cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 para o fracionamento e isolamento dos compostos desta amostra.

Ao todo, foram coletados 28 tubos, sendo agrupados em 6 subfrações, conforme Figura 30.

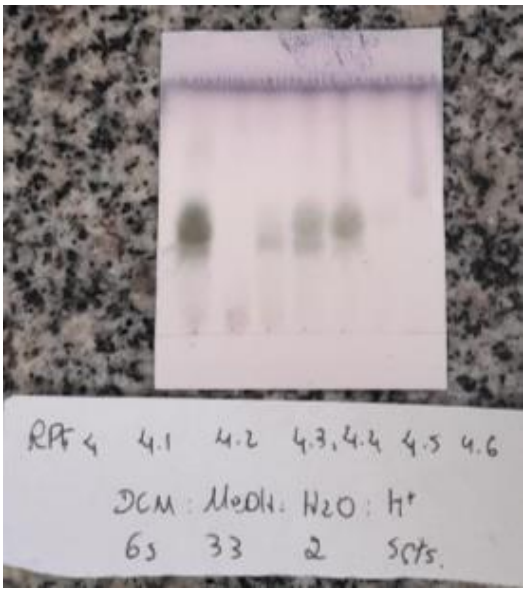
Figura 30 – Fluxograma do fracionamento da fração RPF 04



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Como pode ser observado pela CCD (Figura 31), a fração RPF 4 é formada majoritariamente por duas substâncias que possuem valores muito próximos de Rf. É possível verificar que em RPF 4.2 obteve-se majoritariamente a substância de caráter mais polar (banda verde). Já a RPF 4.3 é formada por ambas as substâncias majoritárias e, em RPF 4.4, a substância de caráter mais apolar é a majoritária.

Figura 31 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas pela separação em Sephadex de RPF 04.



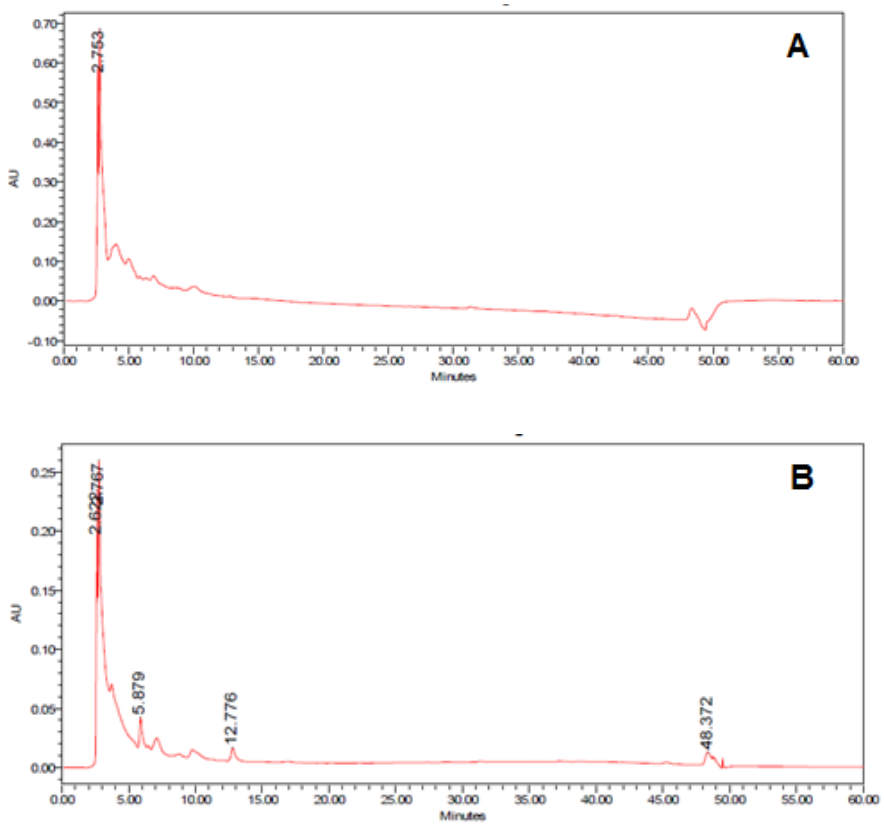
Eluente: diclorometano: metanol: água H^+ (65:33:2 v/v/v); Relevador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A fração RPF 4.4 também foi avaliada em CLAE-DAD (Figura 32). De acordo com os cromatogramas, esta amostra apresenta dois picos majoritários, os quais ocorrem em 2,6 e 2,8 minutos. Tal resultado reflete o observado na CCD dessa amostra, já que apresentavam substâncias com Rf´s muito próximos.

Assim, considerando que nenhuma substância foi isolada, novos métodos deverão ser realizados para alcançar o isolamento destes compostos presentes na fração RPF 4.4.

Figura 32 – Cromatograma de RPF 4.4 por CLAE-DAD avaliado em 230 nm e 280 nm.



Eluente: Gradiente linear 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Em A) Cromatograma avaliado em 230 nm e em B) Cromatograma avaliado em 280 nm.

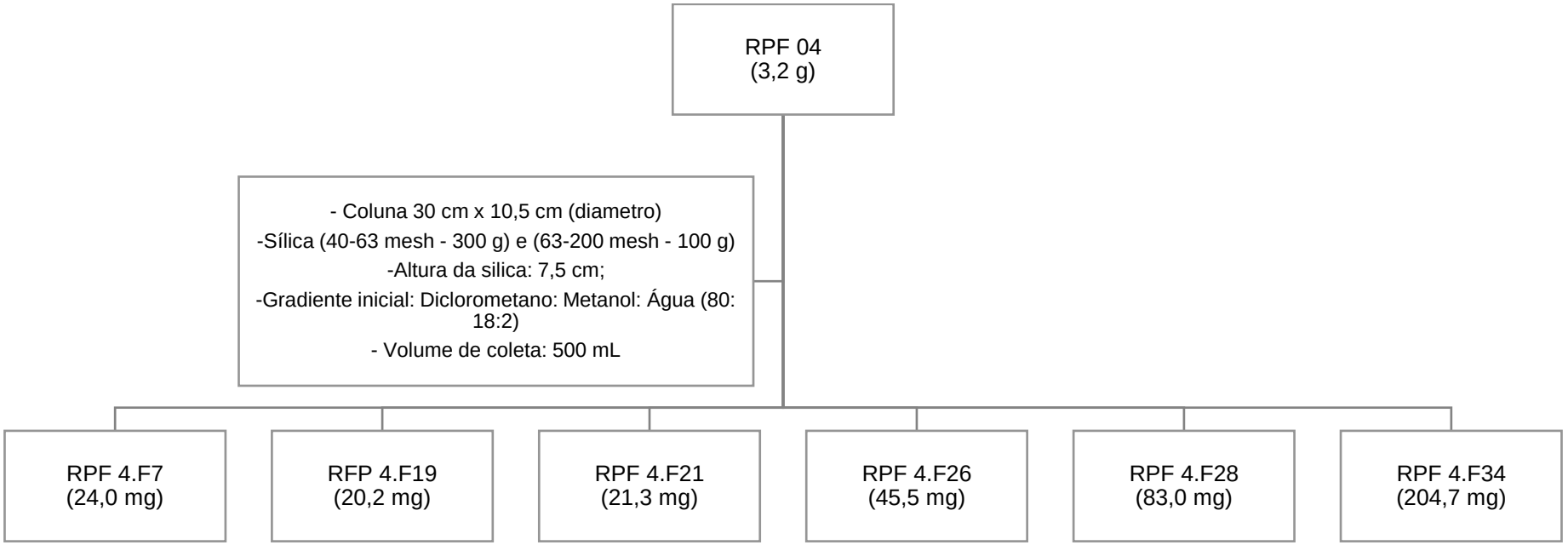
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Desta forma, considerando que as substâncias de interesse não foram isoladas por cromatografia por exclusão, realizou-se o fracionamento desta fração RPF 04 por cromatografia em coluna clássica.

Ao todo foram coletados 65 tubos sendo que uma das bandas de interesse foi observada entre os tubos 19 ao 50 (Figura 33). Contudo, não houve isolamento entre as substâncias de interesse. Por outro lado, durante o processo de secagem das frações foi observado a presença de precipitado nas sub-frações 4.F7, 4.F19, 4.F21, 4.F26, 4.F28 e 4.F34 (Figuras 34), as quais possuem 2 manchas principais, conforme CCD (Figura 35).

.

Figura 33 – Fluxograma da representação parcial do fracionamento por coluna de RPF 04



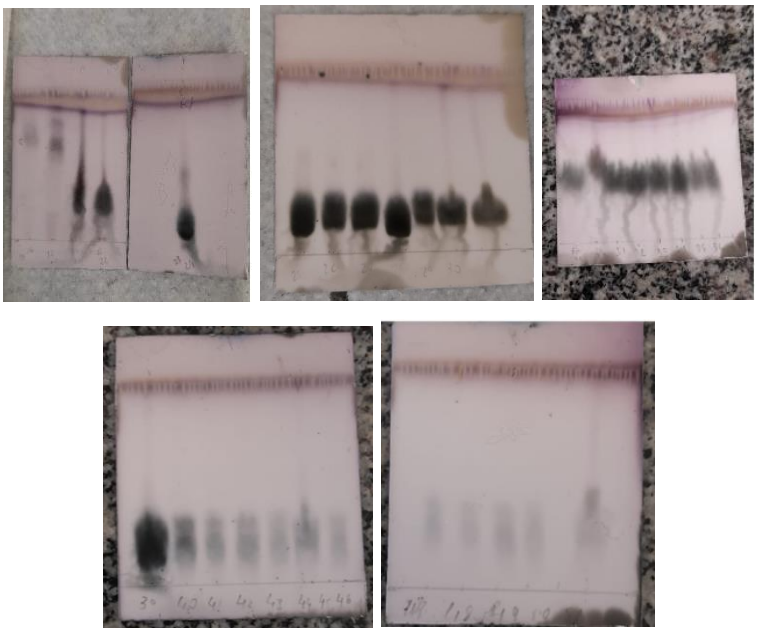
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 34 – Precipitado obtido na fração RPF 4.F34



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 35 – CCD dos tubos 19 – 50 obtidos por cromatografia em coluna clássica.



Eluente: Diclorometano: metanol: água H^+ (65:33:2 v/v); Revelador: anisaldeído sulfúrico;

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Portanto, a partir do fracionamento realizado com o extrato RPF de *R. petasites*, foi possível realizar a purificação parcial de três substâncias: RPF 1.3, RPF 4.4 e RPF 4.F34. Todavia, ainda serão realizados ensaios adicionais para a purificação, bem como para a identificação destas substâncias.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. mansoni.*

De acordo com os resultados obtidos, apenas o extrato bruto fresco (RPF) demonstrou atividade esquistossomicida *in vitro* (Tabela 7). Nesse contexto, existem diferenças na composição química de ambos os extratos, influenciado pelo processo de extração – com secagem ou sem secagem dos rizomas, que consequentemente impactam na atividade biológica.

Ainda de acordo com a tabela 7, a amostra RPF nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL apresentou um percentual de mortalidade de 100% dos vermes adultos, em ambos os sexos após 24h de incubação, acompanhada de redução completa da atividade motora.

É importante observar que na concentração mais baixa, ou seja, 50 µg/mL ocorreu apenas uma redução moderada da atividade motora após 72h de incubação.

Além disso, as frações orgânicas, resultantes do processo de partição líquido-líquido do extrato RPF também foram avaliadas em ensaios esquistossomicidas *in vitro*. Os resultados obtidos (Tabela 7) demonstraram que nenhuma das frações obtidas (RPF 1 a 4) apresentou atividade frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados encontrados para avaliação esquistossomicida *in vitro* sugerem que atividade de RPF não está condicionada a apenas uma substância, mas ao conjunto dos compostos presentes, tendo em vista que as frações orgânicas (RPF 1 a 4) não apresentaram atividade isoladamente.

Tabela 7 – Resultados da avaliação *in vitro* das amostras de *R. petasites* contra vermes adultos de *S. mansoni.*

Grupo	Período de incubação (h)	Morte dos parasitas (%)		Redução da atividade motora (%) *			
				Moderada		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
0,5% DMSO	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
Praziquantel 1 µg/mL	Imediatamente	100	100	-	-	100	100
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
RPF							
200 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
100 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
50 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	100	100	-	-
RPF 01, RPF 02, RPF 03, RPF 04							
200 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
RPS							
200 µg/mL	Imediatamente	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-

* ensaio realizado em triplicata.

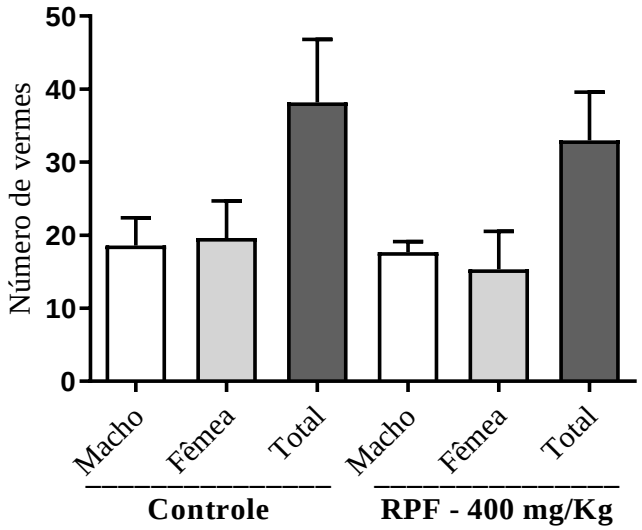
Fonte: Elaborado pela autora, 2022

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO RPF CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. mansoni.*

Considerando a atividade *in vitro* demonstrada pelo RPF, foram realizados estudos em modelo murino para avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* de RPF quando administrada por via oral em dose única na concentração de 400 mg/kg.

Após tratamento oral com RPF (400 mg/kg) foi observada pequena redução na carga total de parasitos de 13,6% em comparação com o grupo controle infectado não tratado, bem como uma pequena redução na carga de parasitos fêmeas em 21,9 % (P<0,05) após o tratamento com RPF (400 mg/kg) em comparação com o controle não tratado (Figura 36). Contudo, as reduções observadas não foram estatisticamente significativas.

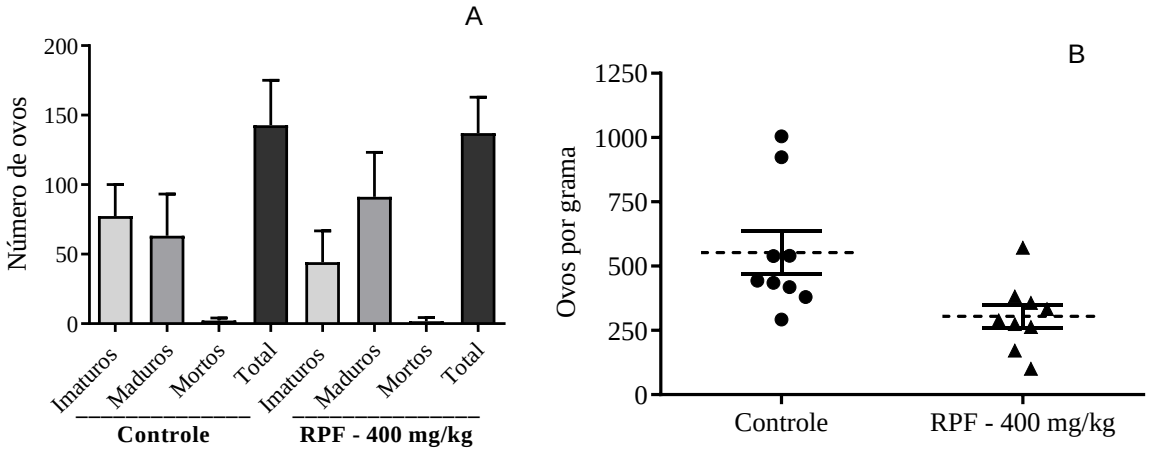
Figura 36 – Efeito na carga parasitária em dose única de RPF.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Da mesma forma que a carga parasitária, o extrato RPF não reduziu significativamente o número de ovos totais ou imaturos dos animais infectados, apresentando redução (não significativa) de cerca de 30% nos ovos por grama (Figura 37).

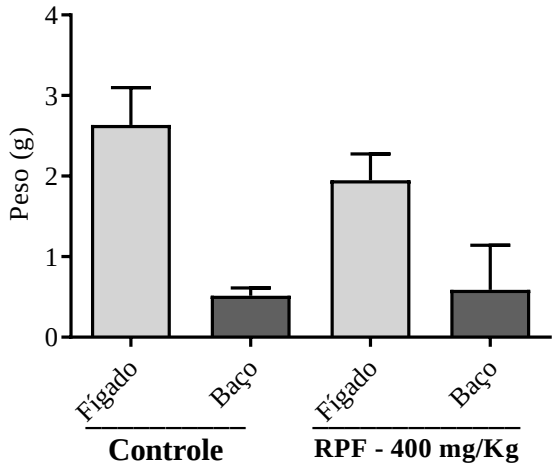
Figura 37 – Efeitos nos estágios de desenvolvimento do ovo após dose única de RPF (A) e Efeito da dose única de RPF sobre a carga de ovos (B).



Barras e pontos representam dados de camundongos individuais que foram infectados e tratados com RPF ou infectados e não tratados (controle). Dose de 400 mg/kg de RPF, administrada a camundongos com infecção por *S. mansoni* adulto de 49 dias de idade.
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Além disso, os resultados demonstraram que no grupo tratado com RPF em dose única de 400 mg/kg não houve redução significativa da hepato ou esplenomegalia (Figura 38).

Figura 38 – Efeito no peso do fígado e do baço após dose única de RPF.



As barras representam dados de camundongos individuais que foram infectados e tratados com RPF ou infectados e não tratados (controle). Dose de 400 mg/kg, em infecções patentes por *S. mansoni*.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados de avaliação da atividade esquistossomicida de RPF *in vivo* são discrepantes dos observados *in vitro* e devem ser repetidos. Os resultados *in vivo,* apesar de não serem estatisticamente significativos, sugerem que o RPF possa exercer fraca eficácia esquistossomicida *in vivo.*

De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que o extrato RPF se mostrou ativo *in vitro* frente ao parasita *S. mansoni*, enquanto o extrato RPS foi inativo nas concentrações avaliadas. Estes resultados corroboram com a diferença no perfil químico observado entre os extratos, os quais foram obtidos por secagem ou não dos rizomas.

Os resultados de avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* sugerem que a atividade observada para RPF é decorrente da ação de vários compostos presentes no extrato, uma vez que as frações obtidas de RPF, diferentemente do RPF, não foram ativas. Além disso, os dados da atividade esquistossomicida *in vivo,* apesar de não serem estatisticamente significativos, sugerem que o RPF possa exercer fraca eficácia esquistossomicida.

Em relação ao estudo fitoquímico de RPF, até o momento foi possível a obtenção de 2 substâncias semipurificadas provenientes de RPF 01 e RPF 04. Novos processos de isolamento e identificação devem ser realizados para que estas substâncias sejam identificadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE A ESPÉCIE VEGETAL *V. polyanthes*

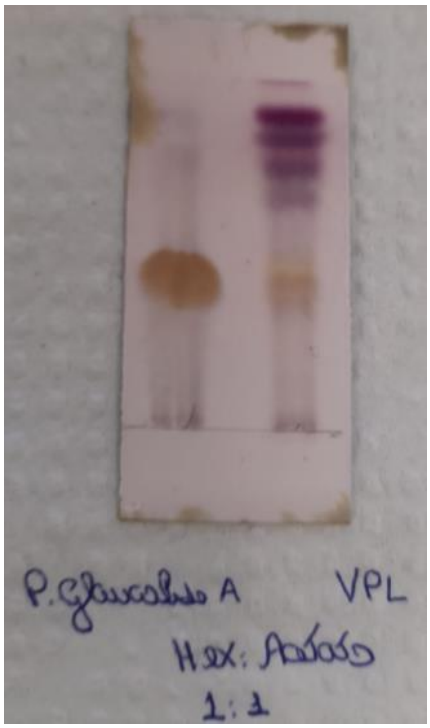
5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO BRUTO

O trabalho de fracionamento cromatográfico de VPL foi realizado de modo a isolar e purificar o componente majoritário deste extrato, a lactona sesquiterpênica Glaucolido A, já previamente identificada e caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa Nippan (Santana *et al*., 2023). Neste sentido, a obtenção de extratos seletivos por meio de lavagem foliar é uma técnica interessante de extração devido a sua facilidade de execução, bem como devido a eficiência na extração das substâncias presentes nos tricomas glandulares das folhas (Santana *et al*., 2023).

Ao final das lavagens realizadas com as folhas de *V. polyanthes*, obteve-se cerca de 11,4 g de extrato bruto (VPL), com rendimento de 55%.

A partir da comparação, por CCD, entre o padrão de Glaucolido A e VPL foi possível verificar que VPL apresenta uma intensa banda com Rf semelhante ao padrão. Além disso, de acordo com os resultados em CCD, o extrato VPL apresenta baixa complexidade, o que é interessante para o processo de isolamento do composto de interesse (Figura 39).

Figura 39 – Comparação cromatográfica por CCD do extrato VPL e o padrão de Glaucolido A.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir da CCD anterior, foi observada a presença de glaucolido A no extrato VPL. Em seguida, o VPL foi submetido ao fracionamento cromatográfico por cromatografia líquida à vácuo (ou cromatografia de baixa pressão). Ao final foram coletadas 26 frações (Tabela 8) que foram reagrupadas em 7 novas subfrações de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico avaliado por CCD, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 8 – Descrição do gradiente de fracionamento e frações recolhidas.

Gradiente Fase móvel	Frações recolhidas
Hex:AcOEt 5%	1
Hex:AcOEt 10%	2, 3 e 4
Hex:AcOEt 20%	5, 6 e 7
Hex:AcOEt 30%	8, 9 e 10
Hex:AcOEt 50%	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18
Hex:AcOEt 70%	19, 20 e 21
AcOEt 100%	22, 23, 24, 25 e 26

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

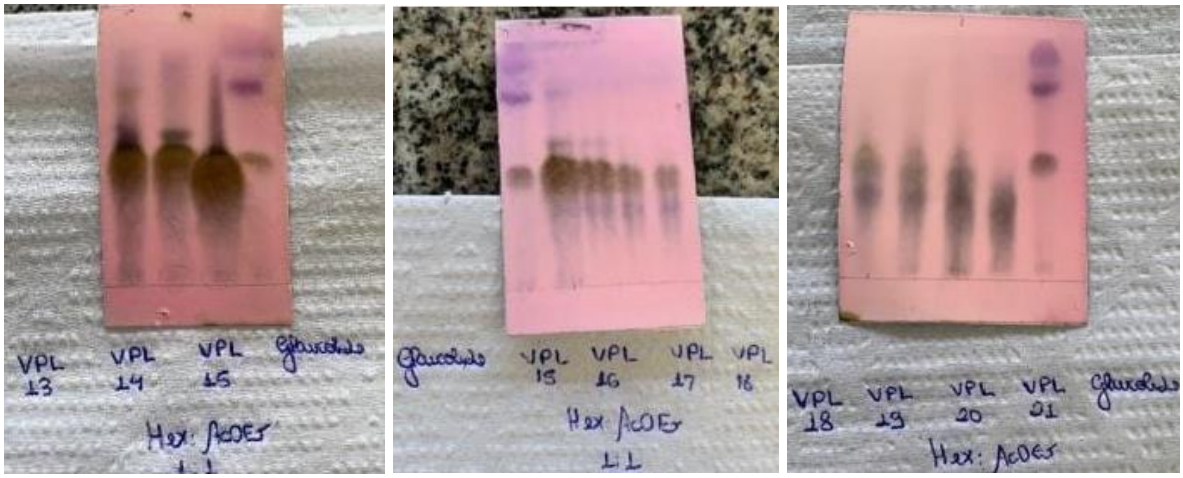
Tabela 9 – Subfrações finais obtidas a partir do fracionamento de VPL por CLV.

Frações agrupadas	Subfrações finais	Massa obtida
1-3	VPL 1	1,0 g
4-6	VPL 2	1,6 g
7-9	VPL 3	0,6 g
10-12	VPL 4	1,2 g
13-18	VPL 5	2,9 g
19-21	VPL 6	0,4 g
22-26	VPL 7	0,8 g

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com as CCD realizada, a fração VPL 5 (fração de 13-18) é a de maior massa obtida e apresentou a substância de interesse, como pode ser observado na Figura 40.

Figura 40 – CCD das frações que apresentaram o composto de interesse frente ao padrão de Glaucolido A.

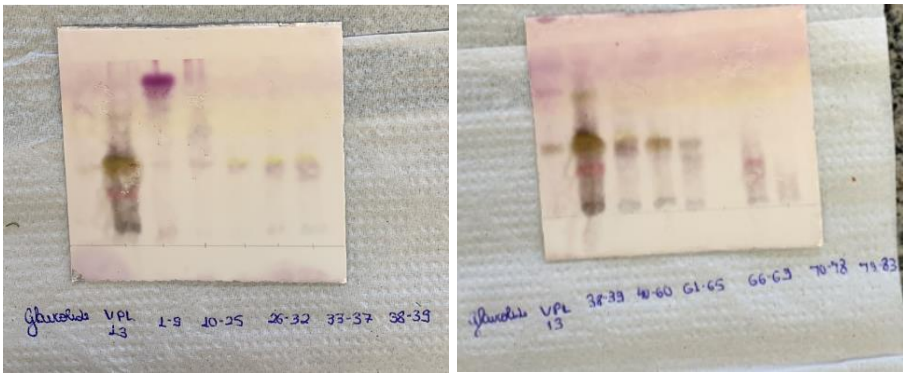


Eluente: Hexano: acetato de etila (1:1 v/v) e solução reveladora anisaldeído sulfúrico.
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Dessa forma, a fração VPL 5 foi submetida ao fracionamento por coluna clássica, sendo coletadas 83 subfrações. Estas foram posteriormente reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico por CCD, sendo ao final geradas 10 subfrações, como pode observado na Figura 41.

As respectivas massas obtidas encontram-se na Tabela 10.

Figura 41 – CCD das subfrações obtidas a partir do fracionamento de VPL-5.



Eluente: Hexano: acetato de etila (1:1 v/v) e solução reveladora anisaldeído sulfúrico.
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 10 – Subfrações de VPL-5 com suas respectivas massas.

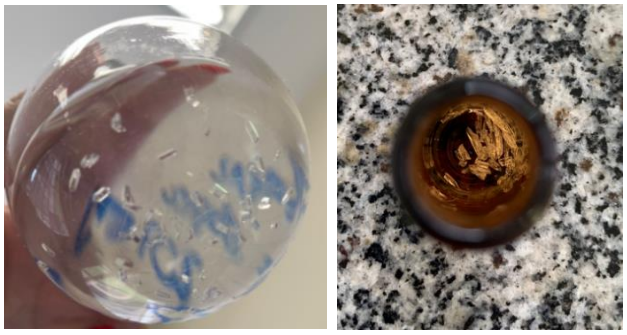
Subfrações	Massa obtida
VPL 1 – 9	30 mg
VPL 10 – 25	48 mg
VPL 26 – 32	28 mg
VPL 33 – 37	58 mg
VPL 38 - 39	36 mg
VPL 40 – 60	1380 mg
VPL 61 – 65	60 mg
VPL 66 – 69	44 mg
VPL 70 – 78	90 mg
VPL 79 – 83	157 mg

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com os resultados, a substância de interesse estava presente na subfração VPL 40-60. Após o processo de eliminação do solvente foi possível observar que a mesma apresentou um aspecto gelatinoso.

Assim, com o objetivo de isolar e purificar a substância de interesse, a subfração VPL 40-60 foi recristalizada com mistura de acetato de etila e hexano. Os cristais obtidos foram removidos mecanicamente, lavados com hexano e levados a evaporação do solvente, sendo denominados GLDA (Figura 42).

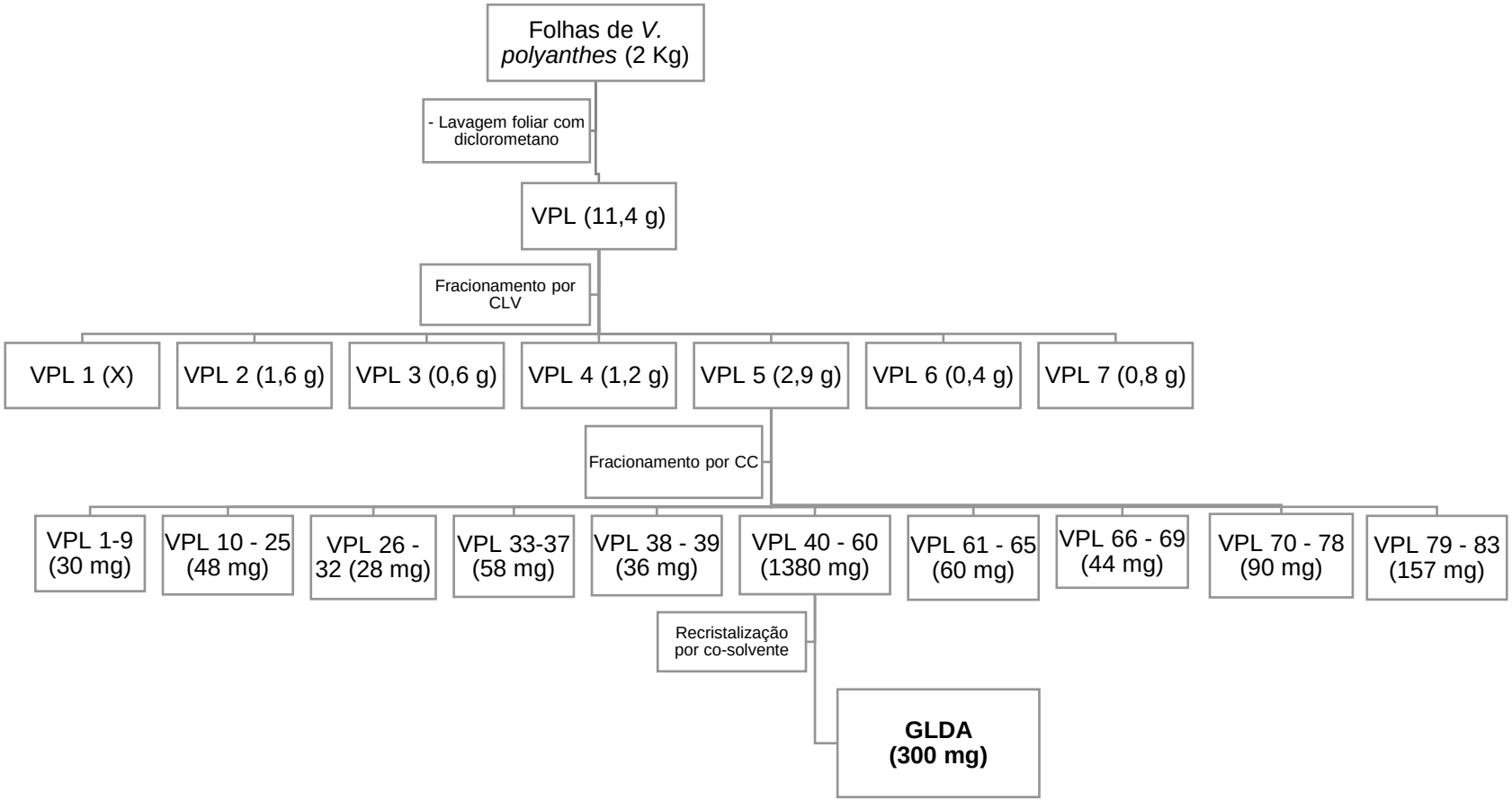
Figura 42 – Cristais formados a partir da recristalização de VPL 40 – 60.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Na Figura 43 encontra-se o fluxograma sobre o fracionamento do extrato VPL até a obtenção de GLDA.

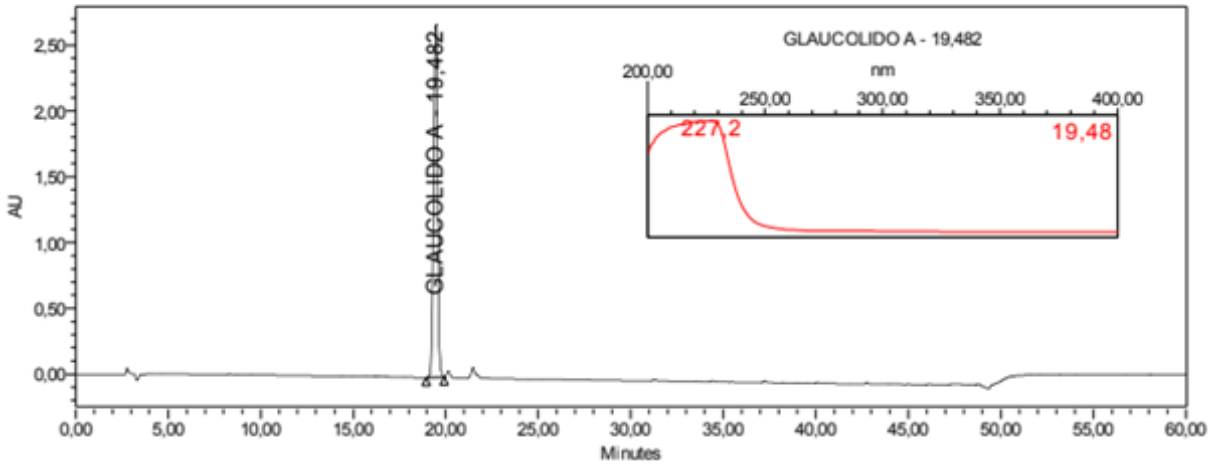
Figura 43 – Fluxograma do processo de obtenção de GLDA.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O perfil cromatográfico do cristal GLDA obtido foi avaliado frente ao extrato bruto VPL e do padrão de glaucolido A por CLAD-DAD, como pode ser observado nas Figuras 44 - 46:

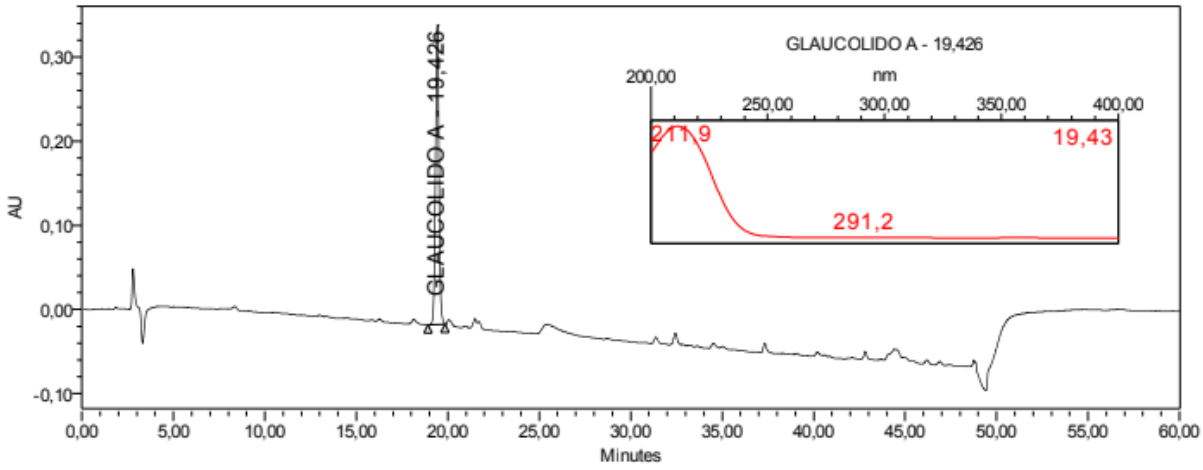
Figura 44 – Análise cromatográfica do padrão de glaucolido A.



Eluente: gradiente linear 40 – 100% de MeOH em 60 minutos. Detecção 230 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

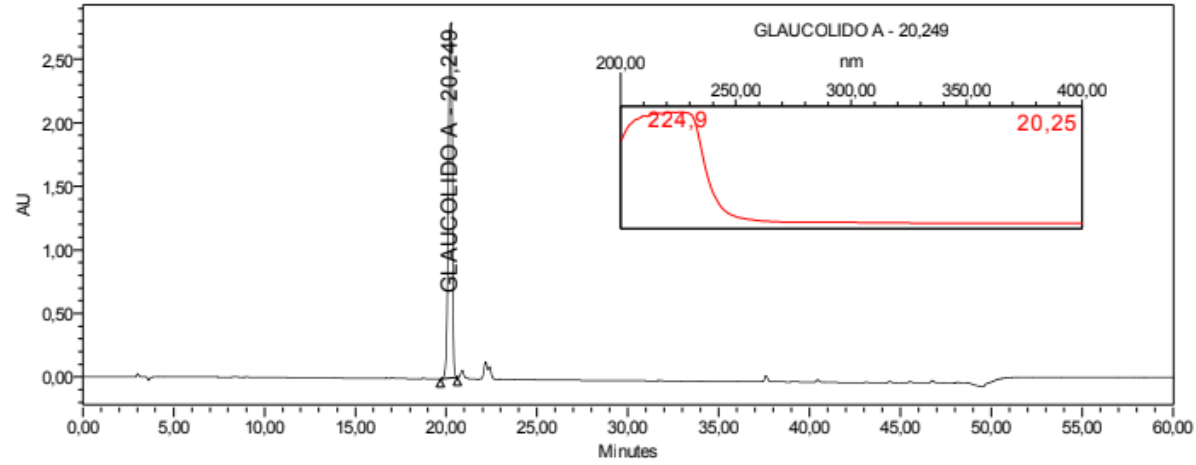
Figura 45 – Análise cromatográfica de VPL.



Eluente: gradiente linear 40 – 100% de MeOH em 60 minutos. Detecção 230 nm.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 46 – Análise cromatográfica de GLDA.



Eluente: gradiente linear 40 – 100% de MeOH em 60 minutos. Detecção 230 nm.

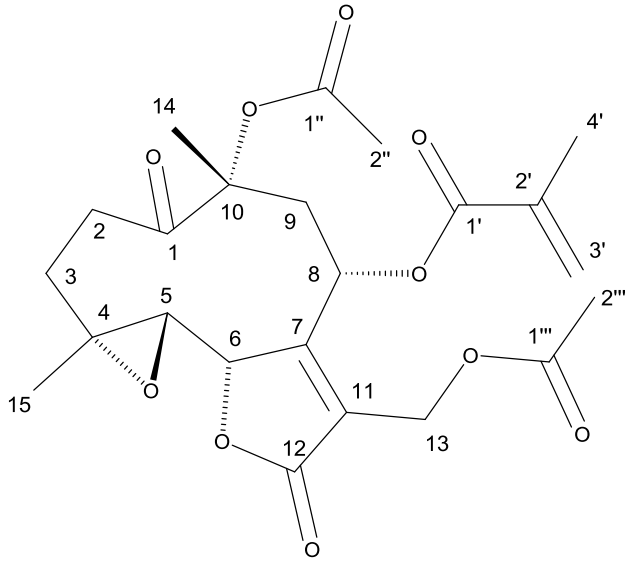
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com os cromatogramas, todas as amostras apresentaram um pico principal com o tempo de retenção em aproximadamente 19 minutos, semelhante ao padrão de glaucolido A.

Além disso, de acordo com os espectros de UV é possível observar que todos estes picos com tempo de retenção em ~ 19 minutos apresentaram semelhanças no perfil espectral, sugerindo que o GLDA obtido seja a substância glaucolido A.

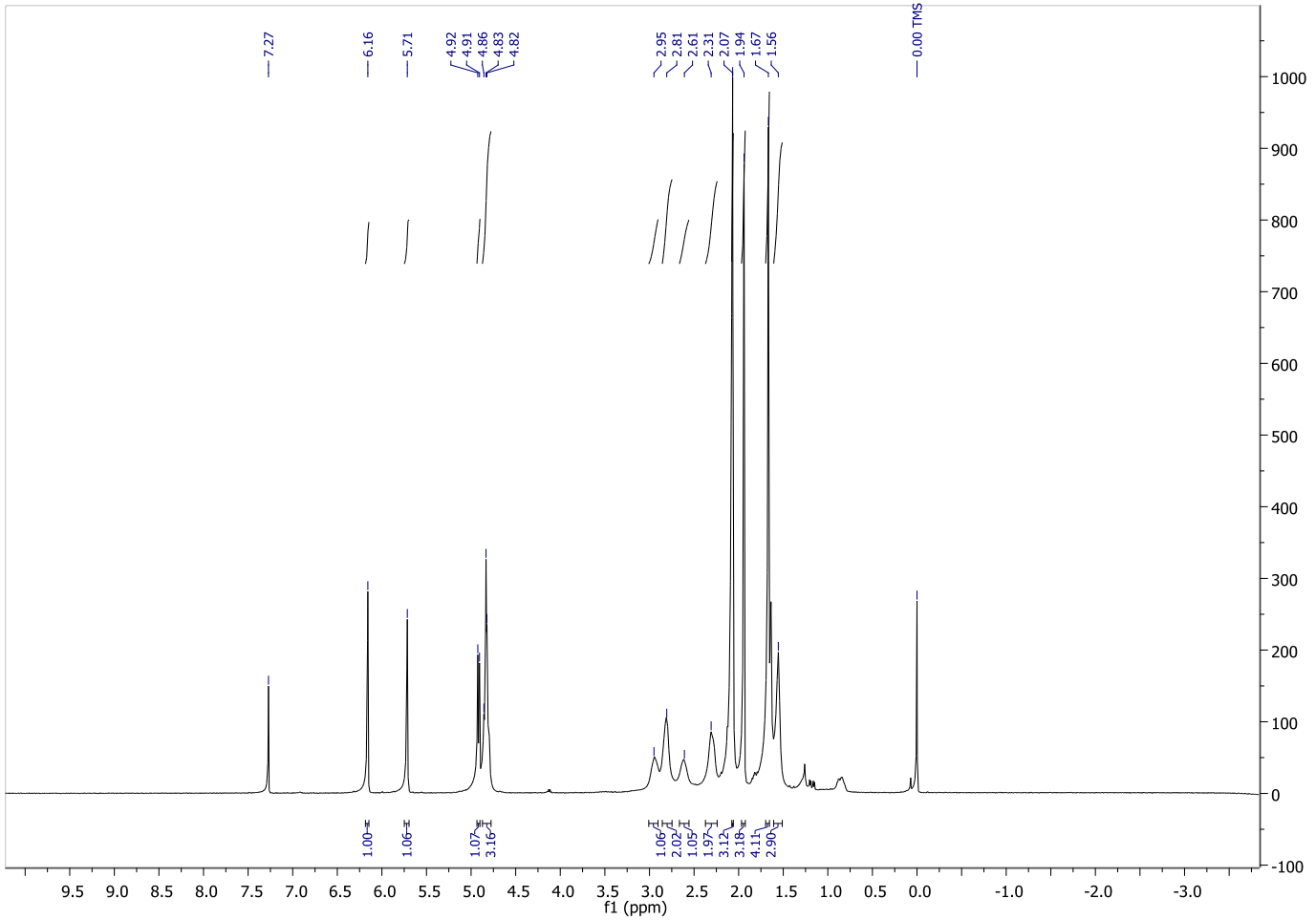
Em relação a identificação estrutural de GLDA por RMN, de ^{1}H é possível observar nas regiões de δ 6,16 e δ 5,71 ppm (Figura 48) a presença de dois tripletos integrados para 1H em cada, sendo esses sinais atribuídos aos hidrogênios vínicos na posição 3'. Além disso, na região de δ 1,94 ppm há 1 quarteto integrado para 3H, sendo esse relacionado ao grupo metila na posição 4' (Figura 47) (Bardón *et al*., 1990; Padolina *et al*., 1974).

Figura 47 – Estrutura química do Glaucolido A.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 48 – Espectro de RMN de ^{1}H de GLDA (500 MHz, $CDCL_3$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Na região de δ 2,07 foi integrado 1 simpleto para 3H sugerindo a presença de grupo acetato correspondente ao hidrogênio do grupo metila na posição 2”. É válido ressaltar que na literatura foi descrito a presença de um simpleto para 3H na região próxima δ 2,06 ppm sendo referente ao hidrogênio do grupo metila na posição 2’’’, entretanto para GLDA tal sinal foi obtido, mas muito próximo ao sinal anterior, não sendo possível a integração. Em δ 1,56 ppm foi integrado um simpleto para 3H sendo atribuído ao grupo metila na posição 15, além disso há um simpleto na posição δ 1,67 correspondente ao grupo metila na posição 14. É válido destacar que a integração desse último para 4H pode ser uma resposta a sobreposição do simpleto em δ 1,67 correspondente ao sinal de hidrogênio 3b, pois de acordo com a literatura grupos metila podem ser identificados como um pico isolado e agudo em sobreposições com absorções de CH (Bardón *et al*., 1990; Padolina *et al*., 1974; Santana *et al*., 2023).

Além disso, na região de δ 4,89 há um simpleto integrado para 1H correspondente a H-6. Além disso, de acordo com os dados comparados com a literatura, os sinais presentes nas regiões de δ 4,83 (3H) e δ 2,31 – 2,95 (totalizando 6H) foram identificados como multipletos e atribuídos aos hidrogênios H-8, H-13a e H-13b e aos hidrogênios H-2a, H-2b, H-3a, H-5, H-9a e H-9b (Bardón *et al*., 1990; Padolina *et al*., 1974; Santana *et al*., 2023). Os dados obtidos no espectro de RMN de ^{1}H de GLDA estão sumarizados na tabela 11.

Tabela 11 – Dados obtidos de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da substância GLDA e dados do glaucolido A descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Experimentais (δ ppm)	Literatura* (δ ppm)
2ª	2,95 (1H, m)	2,93 (1H, ddd, *J*= 17,0; 11,0 e 5,5 Hz)
2b 3ª	2,31 (2H, m)	2,50 (2H, m)
5 9ª	2,81 (2H, m)	2,74 (1H, d, *J*= 9,5 Hz) 2,82 (1H, dd, *J*= 15,5; 7,5 Hz)
8 13a 13b	4,82 (3H, m)	4,83 (1H, dd, *J*= 13,1) 4,90 (1H, dd, *J*= 13,1) 4,93 (1H, d, *J*= 7,5)
6	4,89 (1H)	4,89 (1H, d, *J*= 9,5 Hz)
9b	2,61 (1H, m)	2,41 (1H, d, *J*= 15,5 Hz)
3b 14	1,67 (4H, s)	~1,70 1,67 (3H, s)
15	1,56 (3H, s)	1,61 (3H, s)
3’	6,16 (1H, t) 5,71 (1H, t)	6,16 (1H, t, *J*= 1,0 Hz) 5,69 (1H, t, *J*= 1,0 Hz
4’	1,94 (3H, q)	1,96 (3H, q, *J*= 1,0 Hz)
2”	2,07 (3H, s)	2,07 (3H, s)
2”’		2,06 (3H, s)

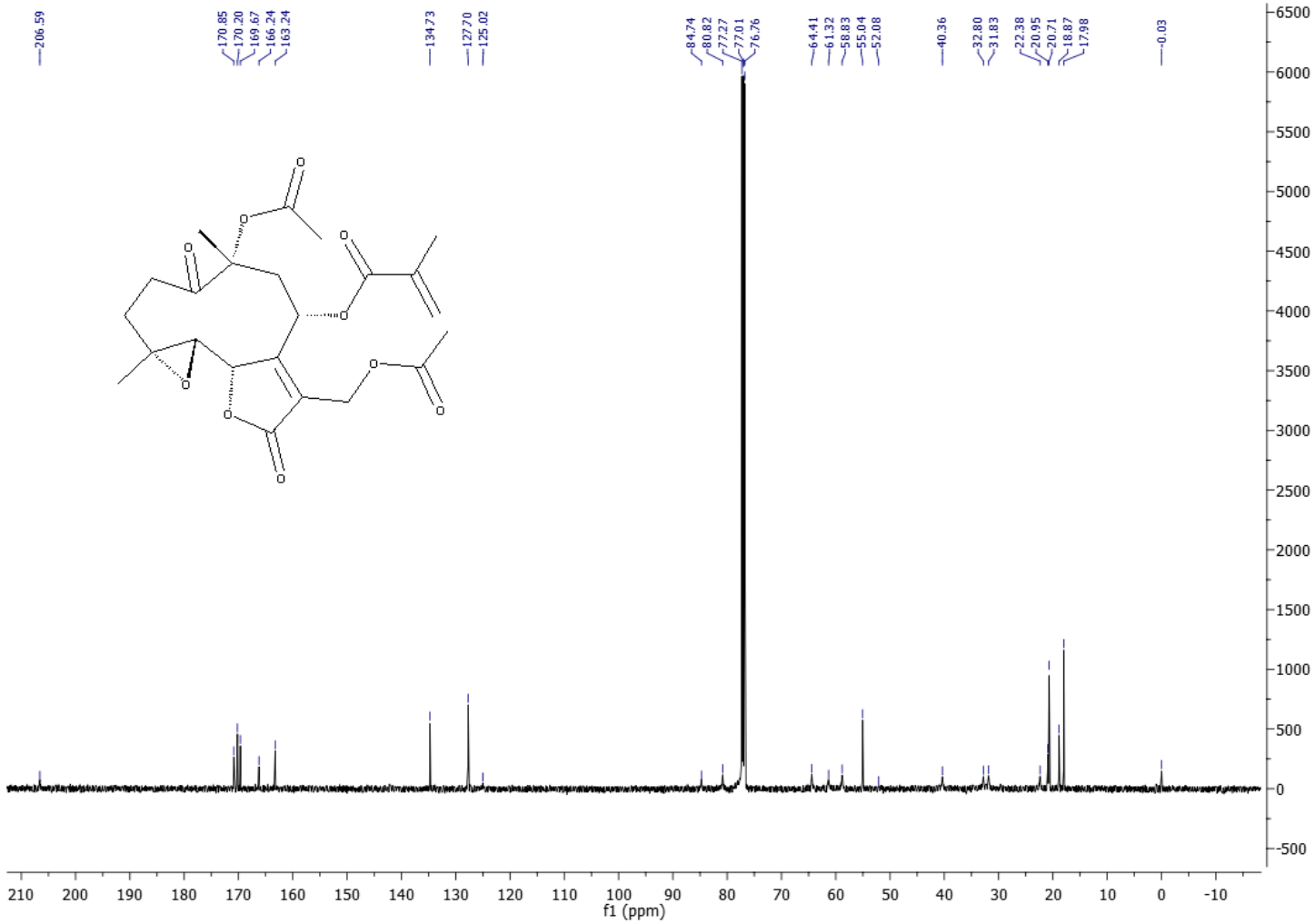
BARDÓN et al.; 1989 (270 MHz, CDCl3). δ: deslocamento químico, *J*: constante de acoplamento, s: simpleto, d: dupleto, dd: duplo dupleto, ddd: duplo dupleto duplo, t: tripleto, q: quarteto, m: multipleto.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para o espectro de RMN de ^{13}C, dispostos na tabela 12 e figura 49, foram identificados 23 tipos distintos de carbonos magnéticos. A partir do deslocamento químico em 206,6 ppm, foi inferida a presença de um grupo carbonila em C-1. Comparando os resultados com a literatura, quatro sinais na faixa de δ 169,7 - 170,2, indicativos de carbonos esterificados, foram atribuídos a C-12, C-1', C-1'' e C-1'''. Outros quatro sinais entre δ 125,0 - 163,3 foram associados a carbonos insaturados (sp2) em C-7, C-11, C-2' e C-3'. Além disso, foram identificados seis sinais entre δ 55,0 - 84,7 correspondentes a carbonos saturados (sp3) ligados a oxigênio em C-4, C-5, C-6, C-8, C-10 e C-13. Por fim, oito sinais na faixa de δ 18,0 - 40,3 foram atribuídos a carbonos metilênicos em C-2, C-3, C-9, e metilas em C-14, C-15, C-4', C-2'' e C-2''', não ligados a elementos eletronegativos (BARDÓN et al., 1989; PAVIA et al., 2010).

De acordo com a comparação realizada entre os dados obtidos experimentalmente de GLDA com os dos dados espectroscópicos da literatura (BARDÓN et al., 1990; PADOLINA et al., 1974) foi possível confirmar que a substância é o glaucolido A ($C_{23}H_{28}O_{10}$).

Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C de GLDA (125 MHz, $CDCL_3$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 12: Dados obtidos de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) da substância GLDA e dados do glaucolido A descritos na literatura.

Carbono	Dados Experimentais (δ ppm)	Literatura* (δ ppm)
1	206,6	207,1
2	32,9	33,3
3	32,8	32,5
4	61,3	61,0
5	58,8	59,5
6	80,8	81,1
7	163,2	162,8
8	64,4	64,5
9	40,3	42,0
10	84,7	84,5
11	125,0	126,0
12	169,6	169,5
13	55,0	55,3
14	18,8	19,1
15		19,1
1’	166,2	166,3
2’	134,7	135,2
3’	127,6	127,2
4’	17,9	17,8
1”	170,8	170,6
2”	20,9	20,8
1”’	170,1	170,0
2”’	20,7	20,5

BARDÓN et al., 1989 (67 MHz, $CDCl_3$).

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUITOSSOMICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO BRUTO E GLDA CONTRA VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*

De acordo com a tabela 13, pode-se observar que tanto o extrato bruto (VPL) bem como a substância isolada (GLDA) foram capazes de provocar a morte de ambos os parasitas, machos e fêmeas, nas concentrações de 50 a 200 µg/mL em todos os tempos de incubação avaliados, sendo que esses resultados foram semelhantes ao grupo tratado com o praziquantel na concentração de 2 µM – medicamento referência para tratamento da esquistossomose. Além disso, também foi a realizada a avaliação de VPL e GLDA em menores concentrações, no qual em 12,5 µg/mL em 24 horas de incubação o extrato foi capaz de matar 50% dos parasitas machos e 100% de fêmeas e GLDA eliminou 100% das parasitas fêmeas.

Tabela 13 – Resultados da avaliação *in vitro* das amostras de *V. polyanthes* contra vermes adultos de *S. mansoni.*

Grupo	Período de incubação (h)	Morte dos parasitas (%)		Redução da atividade motora (%)			
				Moderada		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
0.5 % DMSO	24	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-
Praziquantel 2 µM	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
VPL							
200 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
100 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
50 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
25 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
12,5 µg/mL	24	50	50	-	-	50	50
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
GLDA							
200 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
100 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
50 µg/mL	24	100	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100
12.5 µg/mL	24	50	100	-	-	100	100
	48	100	100	-	-	100	100
	72	100	100	-	-	100	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com a literatura, a espécie *V. polyanthes* demonstrou atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Moreira *et al*., 2017). Entretanto, a atividade esquistossomicida da espécie é inédita e com resultados promissores, uma vez que os dados *in vitro* foram semelhantes ao único fármaco disponível para o tratamento da doença (De Moraes and Lago, 2022; Badoco *et al*., 2022; Queiroz *et al*., 2021; Silva *et al*., 2021a).

A atividade esquistossomicida do glaucolido A (GLDA) também é inédita. Entretanto, a atividade antiparasitária das lactonas sesquiterpênicas já é descrita na literatura. Como exemplo de LSTs com ação antiparasitária estão as substâncias eupatoriopicrina, estafietina e eupahakonenina B, isoladas de outras espécies da família Asteraceae, que apresentaram atividade contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Elso *et al*., 2020).

Além disso, a lactona sesquiterpênica artemisinina indicada para o tratamento da malária, em combinação com praziquantel demonstrou-se efetiva frente a *S. mansoni*, sendo que seus derivados, como arteméter e artesunato, foram ativos às formas mais jovens do parasita como os esquistossomos (Taljaard *et al*., 2023).

Esse contexto reforça que os estudos com *V. polyanthes* e GLDA devem continuar uma vez que os ensaios *in vitro* demonstraram a atividade esquistossomicida tanto para o extrato bruto da espécie quanto para a substância isolada, sendo importante a avaliação da atividade *in vivo*.

Assim, a partir de técnicas cromatográficas e espectroscópicas foi possível verificar que a substância isolada a partir do extrato foliar de *V. polyanthes*, codificada como GLDA é a lactona sesquiterpênica Glaucolido A, anteriormente isolada e identificada na espécie.

Nos ensaios biológicos *in vitro* tanto o extrato bruto (VPL) quanto a substância isolada (GLDA) apresentaram atividades esquistossomicidas promissoras frente a vermes adultos de *S. mansoni*, uma vez que foram capazes de matar os parasitas em concentrações abaixo de 12,5 µg/mL.

Nesse sentido, de acordo com os resultados obtidos *in vitro*, serão realizadas avaliações adicionais da atividade esquistossomicida *in vivo* tanto para o VPL quanto o GLDA, além de estudos de citotoxicidade *in vitro*.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Considerando o uso etnobotânico como antiparasitário, a avaliação da atividade esquistossomicida de extratos e compostos de *Renealmia petasites* e *Vernonia polyanthes* foi avaliada pela primeira vez neste trabalho.

Os estudos demonstraram que o extrato hidroalcoólico dos rizomas frescos de *R. petasites* (RPF) foram ativos *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. Contudo, em ensaios *in vivo,* este extrato não apresentou atividade esquistossomicida estatisticamente significativa nos parâmetros de eficácia pré-clínica avaliados.

Já o extrato foliar de *V. polyanthes* (VPL) e o glaucolido A (GLDA) foram eficazes *in vitro* frente aos vermes de *S. mansoni*, mesmo em baixas concentrações, demonstrando o grande potencial antiparasitário.

Nesse sentido, mais estudos químicos e biológicos são necessários tanto para a caracterização das estruturas químicas das substâncias isoladas quanto para a verificação da eficácia pré-clínica das atividades esquistossomicidas demonstradas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ASANTE-KWATIA, E.; GYIMAH, L.; FORKUO, A. D.; ANYAN, W. K.; GBEMU, M. A.; ARMAH, F. A.; MENSAH, A. Y. Ethnobotanical Survey and Cercaricidal Activity Screening of Medicinal Plants Used for Schistosomiasis Treatment in Atwima Nwabiagya District, Ashanti Region, Ghana. **Journal of Parasitology Research**, 2023. DOI: https://doi.org/10.1155/2023/6707157.

ALVES V, NEVES L. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista Universitária Rural, Série Ciências da Vida**. v.22(2), p.1-8, 2003.

BADOCO, F.R., PAULA, L.A.L., ORENHA, R.P., MENDES, T.M.F., SQUARISI, I.S., EL-SAKKARY, N., LOIOLA, M.C., KATZ, N., TAVARES, D.C., SAIRRE, M.I., PARREIRA, R.L.T., CABRAL, F.J., ALEGRETTI, S.M., CAFFREY, C.R., MAGALH˜AES, L.G., 2022. EF24, a schistosomicidal curcumin analog: insights from its synthesis and phenotypic, biochemical and cytotoxic activities. **Chem. Biol. Interact**. 368, 110191, 2023. DOI: https://doi:10.1016/j.cbi.20 22.110191.

BARDÓN, A.; BORKOSKY, S.; YBARRA, M. I.; MONTANARO, S.; CARTAGENA, E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v. 78, p. 227-231, 2007.

BITCHAGNO, G. T. M.; SCHUFFLER, A.; GROSS, J.; KRUMB, M.; TANE, P.; OPATZ, T. Sesquiterpene Lactones from Vernonia tufnelliae: Structural Characterization and Biological Evaluation. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 7, p. 1681–1690, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esquistossomose. Acesso em: 01/11/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE). **Boletim especial doenças negligenciadas**. Brasília. Número especial. Mar. 2021.

BESHAY, EVN; RADY, AA; AFIFI, AF; MOHAMED, AH. Schistosomicidal, antifibrotic, and antioxidant effects of Cucurbita pepo L. seed oil and praziquantel combined treatment for Schistosoma mansoni infection in a mouse model. **Journal of Helminthology**, v. 93, n. 3, p. 286–294, 2019. DOI: 10.1017/S0022149X18000317.

BRITO, J. R.; WILAIRATANA, P.; ROQUINI, D. B.; PARRA, B. C.; GONÇALVES, M. M.; SOUZA, D. C. S.; FERREIRA, E. A.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; LAGO, J. H. G.; DE MORAES, J. Neolignans isolated from Saururus cernuus L. (Saururaceae) exhibit efficacy against *Schistosoma mansoni*. **Scientific Reports**, v. 12, p. 19320, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-022-23110-2.

CARVALHO, L. S. A.; DE SOUZA, V. C.; RODRIGUES, V. C.; RIBEIRO, A. C.; NASCIMENTO, J. W. L.; CAPRILES, P. V. S. Z.; PINTO, P. F.; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A. A. Identification of Asiaticoside from *Centella erecta* (Apiaceae) as a Potential Apyrase Inhibitor by UF-UHPLC-MS and Its In Vivo Antischistosomal Activity. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1071, 2022.

COSTA, R. A. et al. Theoretical Investigation of the Structural, Spectroscopic, Electronic, and Pharmacological Properties of 4-Nerolidylcathecol, an Important Bioactive Molecule. **Journal of Chemistry**, v. 2019, Article ID 9627404, p. 1-14, 2019. doi: https://doi.org/10.1155/2019/9627404.

DE ALBUQUERQUE, R. D. G.; MAHOMOODALLY, M. F.; LOBINE, D.; SUROOWAN, S.; RENGASAMY, K. R. R. Review Botanical Products in the Treatment and Control of Schistosomiasis: Recent Studies and Distribution of Active Plant Resources According to Affected Regions. **Biology**, v. 9, n. 8, p. 223, 2020. doi: 10.3390/biology9080223.

DE MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*.** Tese (doutorado em biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 801-820, 2015.

DE MORAES, J.; LAGO, J. H. G., 2022. Natural products as lead compounds for the treatment of neglected tropical diseases: dream or reality? **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 22, p. 1607–1609. DOI: 10.4155/fmc-2022-0245.

DE MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALLEGRETI, S. M.; PINTO, P. L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni.* **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, 2014.

DUMAS, N. G. E.; ANDERSON, N. T. Y.; GODSWILL, N. N.; ANA MARIA, M. T. G.; CRISAN, G. C.; LAURIAN, V.; SHARIATI, M. A.; EMMANUEL, Z. T. Y.; Secondary metabolite contents and antimicrobial activity of leaf extracts reveal genetic variability of Vernonia amygdalina and Vernonia calvoana morphotypes. **Biotechonology and Applied Biochemistry**. v. 68. p. 938 – 947, 2021.

ELSO, O. G.; BIVONA, A. E.; ALBERTI, A. S.; CERNY, N.; FABIAN, L.; MORALES, C.; CATALÁN, C. A. N.; MALCHIODI, E. L.; CAZORLA, S. L.; SÜLSEN, V. P. Trypanocidal Activity of Four Sesquiterpene Lactones Isolated from Asteraceae Species. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020. DOI: 10.3390/molecules25092014.

ERIKERT, H. M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, v. 25, p. 5769, 2020.

FERREIRA, L. L. G.; DE MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2278–2287, 2022. DOI: 10.1016/j.drudis.2022.04.004.

GALLON, M. E.; MONGE, M.; CASOTI, R.; COSTA, F. B.; SEMIR, J.; GOBBO-NETO, L. Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 150, p. 93-105, 2018.

GUO, S.Q.; FU, Y.W.; WANG, B.; ZHANG, Q.Z.; XU, D.H.; LIU, Y.M.; HOU, T.L.; Efficacy and antiparasitic mechanism of 10-gingerol isolated from ginger Zingiber officinale against Ichthyophthirius multifiliis in grass carp. **Veterinary Parasitology**, v. 265, p. 74-84, 2019.

IGOLI, N.P.; OBANU, Z. A.; GRAY, A. I.; CLEMENTS, C.; Bioactive diterpenes and sesquiterpenes from the rhizomes of wild ginger (*Siphonochilus aethiopicus* (Schweinf) b.l burtt). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.** v. 9, n. 1, p. 88-93, 2012.

ISMAIL, F. M.D.; NAHAR, L.; ZHANG, K. Y.; SARKER, S. D. Antiparasitic natural products. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. v. 55, 2020.

JAYAWEERA, U.; AKOWUAH, G. A.; LING, C. Y.; KUMAR, P. V.; HERAPATHDENIYA, S. Diabetes and *Vernonia amygdalina* Delile (Asteraceae). **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, p. 4496–4517, 2022.

Kang GQ, Duan WG, Lin GS, Yu YP, Wang XY, Lu SZ. Synthesis of Bioactive Compounds from 3-Carene (II): Synthesis, Antifungal Activity and 3D-QSAR Study of (*Z*)- and (*E*)-3-Caren-5-One Oxime Sulfonates. **Molecules**. 2019 Jan 29;24(3):477. doi: 10.3390/molecules24030477. PMID: 30699975; PMCID: PMC6384770.

LAGO, E. M.; XAVIER, R. P.; TEIXEIRA, T. R.; SILVA, L. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antischistosomal agents: state of the art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 89–120, 2018. DOI: 10.4155/fmc-2017-0112.

LALTHANPUII, P. B.; LALCHHANDAMA, K. Anthelmintic activity of praziquantel and *Spilanthes acmella* extract on an intestinal cestode parasite. **Acta Pharmaceutica**, v. 70, n. 4, p. 551-560, 2020. doi: https://doi.org/10.2478/acph-2020-0039.

LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; LICÁ, I. C. L. Immunomodulating and Anti-parasitic Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. **Revista**

Brasileira de Farmacognosia, v. 33, p. 1110–1125, 2023. doi: https://doi.org/10.1007/s43450-023-00442-2.

LOMBARDO, F. C.; PASCHE, V.; PANIC, G.; ENDRISS, Y.; KEISER. Life cycle maintenance and drug-sensitivity assays for early drug discovery in *Schistosoma mansoni*. **Nature Protocols**, v. 14, p. 461-481, 2019.

LOPES, C. V. G. O **conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do Varzeão, Dr. Ulysses (PR): no contexto do desenvolvimento rural sustentável.** 2010. 162 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LOVERDE, P. T.; Schistosomiasis. ***Digenetic Trematodes*, Advances in Experimental Medicine and Biology 1154**, 2019.

MAAS, P.; MAAS, H. 2015 *Zingiberaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110724>. Acesso em: 10 de novembro de 2022.

MAAS, P.J.M. Renealmia (Zingiberaceae- Zingiberoideae). Costoideae (Additions) (Zingiberaceae). **Flora NeotropicaMonograph**, v.18, p.1-218, 1977.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, B. C.; MORAIS, E R.; BUENO DE CARVALHO MOREIRA, E.; SOARES, C. S.; SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, Vanderlei. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1197-1201, 2009.

MACHADO, A. L.; ARAGÃO, F. M.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, J. R.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; NUNES, E. P.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. (Asteraceae). **Química. Nova** 36 (4) , 2013.

McMANUS, D. P.; BERGQUIST, R.; CAI, P.; RANASINGHE, S.; TEBEJE, B. M.; YOU, H.; Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines. **Semin Immunopathol.** v 42. 355-371, 2020.

McMANUS, D. P.; DUNNE, D.W.; SACHO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALDS, B. J.; ZHOU, N. Schistosomiasis. **Nature Reviews – Primer**.4:13, 2018.

MENGARDA, A.C., SILVA, M.P., CIRINO, M.E., MORAIS, T.R., CONSERVA, G.A.A., LAGO, J.H.G., DE MORAES, J., 2021. Licarin A, a neolignan isolated from *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. (Lauraceae), exhibited moderate preclinical efficacy against *Schistosoma mansoni* infection. **Phytotherapy Research**. 35 (9), 5154–5162. https://doi: 10.1002/ptr.7184.

MINATELI, M. M.; VECHIO-VIEIRA, G.; YAMAMOTO, C. H. ARAÚJO, A. L. S. M.; RODARTE, M. P.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Phytochemical contents and biological properties of *Vernonia polyanthes* less. **International Jounal of Pharmaceutical Sciences and Research.** Vol. 8(3): 1427-1436, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA. Monografia da espécie *Vernonia polyanthes* (“ASSA-PEIXE”). Brasília, 2014.

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

MORAIS, M. L.; CARACAS, T. C. C.; PRINCE, P. M. A.; RAMOS, D. M. B.; LACERDA, G. A. Estruturas foliares de *Vernonia polyanthes* less. (asteraceae) relacionadas com a prospecção de substâncias com potencial medicinal. **Revista Bionorte**, v. 4, n. 2, jul. 2015.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; VARANDAS, R.; COGO, J.; PEREGO, C. H.; RONCOLI, G.; SOUSA, M. C.; NAKAMURA, C. V.; CAVALEIRO, L. S. C. Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less

(Asteraceae). **Natural Product Research**, 31:24, 2905-2908, doi: 10.1080/14786419.2017.1299723, 2017.

MOUJIR, L.; CALLIES, O.; SOUSA, P. M. C.; SHAROPOV, F.; SECA, A. M.L. Applications of Sesquiterpene Lactones: A Review of Some Potential Success Cases. **Applied Science**, 2020, 10, 3001; doi:10.3390/app10093001.

MUYA, K.; KALONJI, M.; ILUNGA, N. W.; MASEHO, M.; KITAMBALA, M.; KALONDA, M.; NDOUMBA, K.; BYANGA, K.; WRIGHT, C. W.; HABERLI, C.; KEISER, J.; SIMBI, L.; Evaluation of 43 species of Congolese medicinal plants used traditionally for the treatment of schistosomiasis leading to the isolation of an anti-schistosomal phaeophytin from *Pseudolachnostylis maprouneifolia* Pax. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 315. 28, 2023.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W.A.; **Parasitologia Humana**. Ed. Atheneu. 13ª edição. 2016.

PADILLA-GONZALEZ, G.; DOS SANTOS, F. A.; DA COSTA, F. B. Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 35:1, 18-37, DOI: 10.1080/07352689.2016.1145956.

MARIETA L.C. PASSOS, M. LÚCIA M.F.S. SARAIVA. 2019. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies, Measurement. v.135, 896-904. doi: https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Advances in Parasitolgy**, v. 6, p. 223-290, 1968.

PEREIRA, C. E. B.; FELCMAN, J. Correlation between five minerals and the healing effect of brazilian medicinal plants. **Biological Trace Element Research**, v. 65, p. 251- 259, 1998.

PEREIRA, V. R.D.; JÚNIOR, I.J.A; DA SILVEIRA, L.S.; GERALDO, R. B.; PINTO, P. F.; TEIXEIRA, F.S.; SALVADORI, M. C.; SILVA, M.P.; ALVES, L.A.; CAPRILES, P.V.S.Z; ALMEIDA, A.D.C; COIMBRA, E.S.; PINTO, P.L.S; COURI, M.R.C; DE MORAES, J.; DA SILVA FILHO, A.A.; In vitro and in vivo antischistosomal activities of chalcones. **Chemistry & Biodiversity**. 2018;15:e1800398.

PEREIRA, V.R.D., DA SILVEIRA, L.S., MENGARDA, A.C., ALVES JÚNIOR, I.J., DA SILVA, O.O.Z., MIGUEL, F.B., SILVA, M.P., ALMEIDA, A.D.C., TORRES, D.D.S., PINTO, P.F., COIMBRA, E.S., DE MORAES, J., COURI, M.R.C., DA SILVA FILHO, A.A., 2021. Antischistosomal properties of aurone derivatives against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica** 213, 105741. https://doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105741.

QUEIROZ, L.S., FERREIRA, E.A., MENGARDA, A.C., ALMEIDA, A.D.C., PINTO, P.F., COIMBRA, E.S., DE MORAES, J., DENADAI, A.M.L., DA SILVA FILHO, A.A., 2021. *In vitro* and *in vivo* evaluation of cnicin from blessed thistle (*Centaurea benedicta*) and its inclusion complexes with cyclodextrins against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**. 120 (4), 1321–1333. doi: https://doi:10.1007/s00436-020-06963-2.

ROCHA E SILVA, L. F.; *et al*. I*n Vivo* Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of 4-Nerolidylcatechol Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3271-3280, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.05012-14>.

ROCHA, F. S.; GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; KALIAGUINE, S.; PATIENCE, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering.** v. 96, 12 p. 2512-2517, 2018.

RODRIGUES, K. C. M.; CHIBLI, L. A.; SANTOS, B. C. S.; TEMPONI, V. S.; PINTO, N. C. C.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. Evidence of Bioactive Compounds from *Vernonia polyanthes* Leaves with Topical Anti-Inflammatory Potential. **International Journal of Molecular Sciences.** 17,1929. doi:10.3390/ijms17121929, 2016.

SANTANA, J. D. G.; SANTOS-MAYORGA, O. A.; FLORENCIO, J. R.; OLIVEIRA, M. C. C.; ALMEIDA, L. M. S.; XAVIER, J. O. L.; ZIMMERMANN-FRANCO, D. C.; MACEDO, G. C.; FERREIRA, A. L. P.; SOUSA, O. V.; DA SILVA, A. A. S.; *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), a Natural Source of Bioactive Compounds with Antibiotic Effect against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus.* **Antibiotics (Basel).** Mar 21;12(3):622. doi: 10.3390/antibiotics12030622, 2023.

SANTOS, L. C.; ALVAREZ-RIVERA, G.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.D.; JOHNER, J.C.F.; BARRALES, F. M.; OLIVEIRA, A. L.; CIFUENTES, A.; IBÁNEZ, E.; MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods of Brazilian “pacova” (Renealmia petasites Gagnep.) oilseeds for the determination of lipid and terpene composition, antioxidant capacity, and inhibitory effect on neurodegenerative enzymes. **Food Chemistry: X**. doi: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100140**,** 2021.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. P. Schistosoma "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2492, 2018.

SILVA, J. D. P; RAMOS, S. B.; ANDRADE, M. D. Análise multivariada da esquistossomose no estado de Minas Gerais: análise de componentes principais. **ABCS Health Sciences.** 43 (2). p. 84-90, 2018.

SILVA, M. P.; DE OLIVEIRA, R. N.; MENGARDA, A. C.; ROQUINI, D. B.; ALLEGRETTI, S. M.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; DE SOUSA, D. P.; PINTO, P. L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 467-472, 2017.

SILVA, M. P.; SILVA, T. M.; MENGARDA, A. C.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; ALENCAR, S. M.; LUZ FILHO, G. C.; BUENO-SILVA, B.; DE MORAES, J., 2021. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in a mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113387, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2020.113387.

SMITHERS, S.R; TERRY, R.J. The infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

SOARES, A. K. C.; JÚNIOR, A. D. D. S.; LORENÇONI, M. F.; CASTRO, J. A. D.; PORTO, F. V. D. A.; PESSOA, I. S.; TOLEDO E SILVA, M. V.; PEREIRA, A. C. H.; MORAES, F. D. S. A.; ANDRADE, T.U.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; BARTH, T.; FRONZA, M. In vitro and in vivo anti‑inflammatory activity and chemical composition of *Renealmia petasites* Gagnep. **Inflammapharmacology**. v. 29, p. 451-465, 2021.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. P.; Schistosoma “Eggs-Iting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers Immunology**. v. 9, 2492, 2018.

SPINOZZI, E. *et al*. Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Industrial Crops and Products,** v. 172, 2021. doi: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114027.

SULISTYOWATY, M. I.; UYEN, N. H.; SUGANUMA, K.; CHITAMA, B.Y.A; YAHATA, K. KANEKO, O.; SUGIMOTO, S.; YAMANO, Y.; KAWAKAMI, S. OTSUKA, H.; MATSUNAMI, K. Six New Phenylpropanoid Derivatives from Chemically Converted Extract of Alpinia galanga (L.) and Their Antiparasitic Activities. **Molecules**, v. 26. 1756, 2021.

TALJAARD, L.; HAYNES, R. K.; VAN DER KOOY, F.; *Artemisia* species and their active constituents for treating Schistosomiasis. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 33, p. 875–885, 2023. doi: https://doi.org/10.1007/s43450-023-00407-5.

TEMPONI, V. D.S.; DA SILVA, J. B.; ALVES, M. S.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; PINTO, M. A. O.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; DE SOUSA, O. V. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Vernonia polyanthes* Leaves in Rodents. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 13, n. 3, p. 3887-3899, 2012.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus Vernonia (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 681–723, 2013.

THOMAS, C. M.; TIMSON, D. J. The Mechanism of Action of Praziquantel: Can New Drugs Exploit Similar Mechanisms? **Bentham Science Publishers**, v. 27, p. 676-696, 2020.

XAVIER, E. S.; DE SOUZA, R. L.; RODRIGUES, V. C.; MELO, C. O.; ROQUINI, D. B.; LEMES, B. L.; WILAIRATANA, P.; OLIVEIRA, E. E.; DE MORAES, J., 2022. Therapeutic efficacy of carvacrol-loaded nanoemulsion in a mouse model of schistosomiasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 917363. doi: https://doi.org/10.3389/fphar.2022.917363.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis\. Acesso em: 01 de novembro de 2022.

ZAGÓRSKA, J.; KUKULA-KOCJ, W.; CZOP, M.; HOWIECKA, K.; KOCH, W. Impact of Thermal Processing on the Composition of Curcuma longa Rhizome. **Foods**, 2023, v. 12, p. 3086. doi: https://doi.org/10.3390/foods12163086.