

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

CLARISSA CAMPOS BARBOSA DE CASTRO

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO  
DICLOROMETÂNICO E METABÓLITOS DAS  
INFLORESCÊNCIAS DE *Piper aduncum* L. (Piperaceae)

JUIZ DE FORA, MG

2013

CLARISSA CAMPOS BARBOSA DE CASTRO

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO  
EXTRATO DICLOROMETÂNICO E METABÓLITOS DAS  
INFLORESCÊNCIAS DE *Piper aduncum* L. (Piperaceae)

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

Orientador: Prof. Dr. Ademir Alves da Silva Filho

JUIZ DE FORA

2013

**Atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato diclorometânico e metabólitos das inflorescências de *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**

**Clarissa Campos Barbosa de Castro**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2013

---

Prof. Dr. Josué de Moraes

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Dutra Rocha

---

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

*"Esforça-te, e tem bom ânimo;  
não temas, nem te espantes;  
porque o SENHOR teu Deus é contigo,  
por onde quer que andares."*

(Josué 1:9)

**Bíblia Sagrada**

*Aos meus pais Rômulo e Maria Alice, aos meus  
irmãos Guilherme e Gabriel e ao meu companheiro  
de jornada Paulo Henrique, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me conduzir até aqui!

À minha mãe pela formação, dedicação e profissão Farmacêutica.

Ao meu pai pelo amor e incentivo de me aperfeiçoar cada vez mais.

Ao meu amado Paulo Henrique, companheiro de todas as horas, pela força e dedicação.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos, ao Joaquim e a Maristela.

Agradeço também a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. Dentre estas, o Prof. Ademar que desde o início me recebeu, como “filha científica”, de braços abertos e sempre disposto a me orientar, independente da hora.

À Prof.<sup>a</sup> Dina, “mãe científica”, pelo carinho e por me ensinar colocar amor em tudo que faço.

À família NIPPAN, pelo ótimo convívio, amizade e aprendizado.

À Prof.<sup>a</sup> Priscila de Faria-Pinto por me receber sempre com um sorriso no rosto me transmitindo calma e ensinamentos.

Ao laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, pelo suporte constante oferecido na realização deste trabalho, em especial à Celinha, Prof.<sup>a</sup> Fabíola e Prof.<sup>a</sup> Magda.

Aos colaboradores na realização dos ensaios esquistosomicidas Dr. Josué de Moraes e Dra. Priscila de Faria-Pinto.

Ao Departamento de Química da UFJF pelo uso do aparelho de RMN.

Aos amigos da segunda turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF pela amizade, em especial à Mirna minha companheira de bancada.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos passados.

À Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade desta conquista.

Ao Programa REUNI/CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelos recursos fornecidos para a execução deste projeto.

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

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença que afeta cerca de 240 milhões de pessoas no mundo e mais de 700 milhões estão expostas ao risco de contraí-la, sendo que no Brasil, o Estado de Minas Gerais é um dos mais afetados com esta parasitose. Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento desta doença é o praziquantel (PZQ). No entanto, este medicamento já está no mercado há décadas e tem demonstrado relatos de ineficácia. Neste contexto, extratos e metabólitos secundários obtidos de espécie do gênero *Piper* (Piperaceae) têm demonstrado expressiva atividade esquistossomicida. Assim, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das inflorescências de *Piper aduncum* L. (**PaI**), bem como a avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato, frações e dos metabólitos obtidos. No estudo fitoquímico, a fração clorofórmica, obtida do **PaI**, foi submetida ao fracionamento cromatográfico por meio de colunas de sílica gel, o que culminou no isolamento e identificação de quatro metabólitos: uma diidrochalcona, uma chalcona e duas flavanonas, sendo relatada pela primeira vez a presença da diidrochalcona uvangoletina e da chalcona cardamonina nesta espécie de *Piper*. No estudo esquistossomicida *in vitro* foi utilizado vermes adultos de *S. mansoni* da linhagem BH e os parâmetros avaliados foram mortalidade, motilidade e alterações tegumentares. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato diclorometânico bruto (**PaI**), na concentração de 200 µg/mL, possui expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* ao ser capaz de causar a morte de 100% dos parasitos após 24 h de incubação. Em relação à atividade esquistossomicida das frações obtidas deste extrato, a clorofórmica (200 µg/mL) foi a mais ativa ao provocar a morte de todos os vermes após 48 h, enquanto a fração hexânica, na mesma concentração, só foi capaz de provocar tal efeito após 72 h de incubação. Em contrapartida, a fração em acetato de etila demonstrou-se inativa frente aos parasitos. Dentre as substâncias isoladas da fração clorofórmica, a cardamonia foi a mais ativa ao provocar, na concentração de 25 µM, a morte e lesões tegumentares em 100% dos vermes adultos de *S. mansoni* em apenas 24 h de incubação. Já uvangoletina demonstrou pouco ativa e a flavanona pinocembrina inativa, ambas testadas na concentração de 100 µM. Os resultados obtidos neste estudo, aliados aos já alcançados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram o grande potencial de chalconas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; *Piper aduncum* L.; esquistossomicida; chalconas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease that affects more than 240 million individuals in the world and 700 million people in the world remain under risk of infection. In Brazil, the Minas Gerais state is one of the most affected by this disease. Nowadays, the only drug available for treatment of disease is praziquantel (PZQ). However, this drug is already on market for decades and has shown ineffectiveness. In this context, extract and secondary metabolites of the genus *Piper* (Piperaceae) have shown an expressive schistosomicidal activity. Thus, the present work describes the phytochemical study of the dichloromethane extract of *Piper aduncum* L. (**PaI**) inflorescences, as well as its *in vitro* schistosomicidal evaluation and its fractions and metabolites. The phytochemical study, the chloroform fraction, obtained by **PaI**, was subjected to fractionation using chromatographic on silica gel columns that allowed the isolation and identification of four metabolites: one dihydrochalcone, one chalcone and two flavanones, from which the dihydrochalcone uvangoletin and the chalcone cardamonin were reported for the first time in this species of *Piper*. In the *in vitro* schistosomicidal study, was used adult worms of the *S. mansoni* BH strain and the parameters evaluated were mortality, motility and alterations tegumental surface. The results this study showed that the crude dichloromethane extract (**PaI**), at 200 µg/mL, show has expressive schistosomicidal activity being able to cause 100% of death in parasites after 24 h of incubation. Relative schistosomicidal activity of the fractions, chloroform fractions (200 µg/mL) was the most active being able to death of all worms after 48 h , while hexane fractions, at the same concentration, also being able to cause this effect after 72h of incubation. On the other hand, ethyl acetate fractions show inactive. Among pure compounds obtained from chloroform fraction, cardamonin was the most active, being able, at 25 µM, to both kill and cause tegumental alterations in 100% of adult worms of *S. mansoni* in the first 24 h of incubation. On the other hand, uvangoletin showed weak activity, while flavanone pinocembrin was inactive, both at concentration of 100 µM. The results obtained in this study, combined with those already achieved by our research group, demonstrate the great potential of chalcones as prototypes for the development of new antischistosomal drugs.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; *Piper aduncum* L.; schistosomicidal; chalcone



## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	- Acetato de etila
AFA	- Ácido acético glacial: formaldeído: etanol: água destilada (2: 9:30: 59)
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CCDP	- Cromatografia de camada delgada preparativa
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
DMSO	- Dimetilssulfóxido
d	- Duplete
dd	- Duplo duplete
Hex	- Hexano
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
M	- Multiplete
Me <sub>2</sub> CO	- Acetona
MeOH	- Metanol
MeOD	- Metanol Deuterado
MHz	- Megahertz
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OXA	- Oxamniquina
P.A.	- Pró-análise
PaI	- Extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum L.</i>
PaI-Fa	- Fração em acetato de etila do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aducum L.</i>

PaI-Fc	- Fração clorofórmica do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aducum</i> L.
PaI-Fh	- Fração hexânica do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aducum</i> L.
PZQ	- Praziquantel
ppm	- Parte por milhão
RMN de $^{13}\text{C}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de $^1\text{H}$	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
s	- Simpleto
t	- Tripleto
UI	- Unidade Internacional
UI/mL	- Unidades Internacional por mililitro
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume por volume
$\mu\text{g}$	- Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	- Micrograma por mililitro
$\mu\text{M}$	- Micromolar
$\mu\text{m}$	- Micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> . .....	3
Figura 2	Estrutura química do Praziquantel.....	4
Figura 3	Substâncias, obtidas de plantas, com atividade antiparasitária.....	5
Figura 4	Foto das partes aéreas de <i>P. aduncum</i> L.....	9
Figura 5	Amidas isoladas de espécies de <i>Piper</i> .....	14
Figura 6	Diagrama geral do procedimento de partição líquido/líquido do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L. ....	20
Figura 7	Fluxograma do isolamento dos metabólitos majoritários da fração clorofórmica das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L.....	25
Figura 8	Imagens tridimensionais da região dorsal de um macho de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	29
Figura 9	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da PaI-Fc-C5 <sub>(10-14)</sub> . Expansão dos sinais dos hidrogênios H-3eq. (δ= 2,75 ppm), H-3ax. (δ= 3,04 ppm) e H-2 (δ= 5,41 ppm).. .....	30
Figura 10	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da PaI-Fc-C5 (10-14). Expansão dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B (δ= 7,40 ppm), e dos hidrogênios aromáticos do anel A, H-6 e H-8 (δ= 5,91 e 5,93 ppm).....	31
Figura 11	Estrutura química da (S)-5,7-dihidroxi-flavanona.....	32
Figura 12	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da (S)-5,7-dihidroxi-flavanona.....	34
Figura 13	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da (S)-5,7-dihidroxi-flavanona (75 MHz, MeOD).....	36
Figura 14	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da PaI-Fc-C6 <sub>(26-29)</sub> . Expansão dos sinais dos hidrogênios α (δ= 3,21 ppm) e β (δ= 2,88 ppm) carbonílicos. ...	36
Figura 15	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da PaI-Fc-C6 <sub>(26-29)</sub> . Expansão dos sinais dos hidrogênios: H-3' e H-5' (δ= 5,85 e 5,91 ppm) do anel A ; H-aromáticos do anel B (δ= 7,19 ppm) e H-metílicos (δ= 3,78 ppm)...	38
Figura 16	Estrutura química da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona.....	39

Figura 17	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxidiidrochalcona.....	41
Figura 18	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxidiidrochalcona (75 MHz, MeO).....	43
Figura 19	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da PaI-Fc-C <sub>6(30-35)</sub> . Expansão dos hidrogênios $\alpha$ , $\beta$ carbonílicos ( $\delta= 7,94$ e $7,71$ ppm) e dos hidrogênios do anel aromático B ( $\delta= 7,64$ e $7,45$ ppm).....	46
Figura 20	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da PaI-Fc-C <sub>6(30-35)</sub> . Expansão da região dos hidrogênios aromáticos H-3' e H-5' do anel aromático A.....	47
Figura 21	Estrutura química da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona.....	48
Figura 22	Estrutura química das possíveis flavanonas. A: 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (pinostrobina); B: 5-metoxi-7-hidroxi-flavanona (alpinetina).....	50
Figura 23	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da pinostrobina ou alpinetina (300 MHz, MeOD).....	51
Figura 24	Efeito da cardamonina no tegumento de machos de <i>S. mansoni</i> .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários fixos isolados de <i>P. aduncum</i> L.....	11
Tabela 2	Frações obtidas por CLV da fração PaI-Fc.....	21
Tabela 3	Frações obtidas por CC da fração PaI-Fc-C5.....	22
Tabela 4	Frações obtidas por CC da fração PaI-Fc-C6. ....	22
Tabela 5	Subfrações obtidas por meio de coluna <i>flash</i> da fração PaI-Fc-C7 e C8 .....	23
Tabela 6	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da PaI-Fc-C5 <sub>(10-14)</sub> e dados da 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina) descritos na literatura.....	33
Tabela 7	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (75MHz, MeOD) da PaI-Fc-C5 <sub>(10-14)</sub> e dados da 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina) descritos na literatura.....	35
Tabela 8	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da PaI-Fc-C6 <sub>(26-29)</sub> e dados da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina) descritos na literatura.....	40
Tabela 9	Dados de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, MeOD) da PaI-Fc-C6 <sub>(26-29)</sub> e dados da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina) descritos na literatura.....	42
Tabela 10	Comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5' de ambas as diidrochalconas.....	45
Tabela 11	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da PaI-Fc-C6 <sub>(30-35)</sub> e dados da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona (cardamonina) descritos na literatura.....	48
Tabela 12	Dados de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, MeOD) da PaI-Fc-C7e C8 <sub>(16) III</sub> e dados da 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (pinostrobina) e da 5-metoxi-7-hidroxi-flavanona (alpinetina) descritos na literatura. .	50
Tabela 13	Efeito do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L. frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	53
Tabela 14	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> da fração, hexânica (PaI-Fh), clorofórmica (PaI-Fc) e acetato de etila (PaI-Fa), obtidas por meio da partição (líquido/líquido) do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L. frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	55

Tabela 15	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> das substâncias isoladas da fração clorofórmica (pinocembrina, uvangoletina e cardamonina) obtida a partir do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L. frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	57
Tabela 16	Atividade esquistossomicida da cardamonina em diferentes concentrações frente a vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	60

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	ESQUISTOSSOMOSE .....	1
1.2	PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS.....	5
1.3	FAMÍLIA PIPERACEAE.....	7
1.4	GÊNERO <i>Piper</i> .....	8
1.5	<i>Piper aduncum</i> L. ....	8
2	OBJETIVOS.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS.....	17
3.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	18
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS INFLORESCÊNCIAS DE <i>P. aduncum</i> L.....	18
3.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS INFLORESCÊNCIAS UTILIZANDO PROCESSO DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	19
3.5	ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS DE <i>P. aduncum</i> L.....	20
3.5.1	Estudo da PaI-Fc.....	20
3.5.1.1	Fração PaI-Fc-C5.....	21
3.5.1.2	Fração PaI-Fc-C6.....	22
3.5.1.3	Fração PaI-Fc-C7 e C8.....	23
3.5.1.3.1	Fração PaI-Fc-C7 e C8 <sub>(16)</sub> .....	23
3.6	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA...	26
3.6.1	Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> . ....	26
3.6.1.1	Linhagem do <i>S. mansoni</i> .....	26
3.6.1.2	Manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> .....	26
3.6.2	Preparo das amostras para o ensaio.....	27
3.6.3	Ensaio <i>in vitro</i> .....	27
3.6.3.1	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> das amostras.....	28
3.6.3.2	Análise morfológica do tegumento de vermes adultos utilizando microscopia confocal.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.	30
4.1.1	Substância PaI-Fc-C5 <sub>(10-14)</sub> .....	30
4.1.2	Substância PaI-Fc-C6 <sub>(26-29)</sub> .....	37
4.1.3	Substância PaI-Fc-C6 <sub>(30-35)</sub> .....	45
4.1.4	Substância PaI-Fc-C7 e C8 <sub>(16)</sub> III.....	49

4.2	ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS INFLORESCÊNCIAS DE <i>P. aduncum</i> FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i> .....	52
4.2.1	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de <i>P. aduncum</i> (PaI) e suas frações orgânicas obtidas (PaI-Fc, PaI-Fh, PaI-Fa).....	52
4.2.2	Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> das substâncias isoladas da fração PaI-Fc das inflorescências de <i>P. aduncum</i> L.....	56
4.2.3	Avaliação do efeito esquistossomicida <i>in vitro</i> da 2',4'- dihidroxi-6'-metoxi-chalcona (cardamonina) em diferentes concentrações.....	59
5	CONCLUSÃO .....	64
6	REFERÊNCIAS .....	65



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose ou bilharzíase, uma doença crônica causada pelo trematódeo digenético do gênero *Schistosoma* (Schistosomatidae), é considerada uma das doenças negligenciadas tropicais mais prevalentes no mundo gerando consequências significativas tanto para a economia quanto para saúde pública (GRYSEELS et al. 2006, HOTEZ et al., 2007; VANDERSTRAETE et al., 2013 ).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esquistossomose afeta, em todo o mundo, cerca de 240 milhões de pessoas, sendo que mais de 700 milhões estão expostas ao risco de contraí-la. A ocorrência desta doença é típica de países pobres ou em desenvolvimento, onde a população carece de educação sanitária, o acesso à água potável e ao saneamento básico é restrito ou inexistente e, além disso, os recursos para investimento em saúde pública são escassos (HOTEZ et al., 2007; STEINMANN et al., 2006; SILVA et al., 2012).

Nesses países, a doença acarreta graves consequências representadas pelos altos índices de mortalidade, redução da produtividade dos adultos, comprometimento do desenvolvimento e capacidade de aprendizado das crianças (LINDOSO & LINDOSO, 2009; UTZINGER et al., 2011). De fato, crianças em idade escolar são as mais vulneráveis à esquistossomose, sofrendo, muitas vezes, sério comprometimento físico e cognitivo, o que leva a uma geração de adultos desfavorecidos pelas sequelas irreversíveis e incapacitantes da infecção (FENWICK et al., 2003).

Há várias espécies de *Schistosoma* causadoras da esquistossomose humana, a saber: *S. mansoni*; *S. japonicum*; *S. mekongi*; *S. haematobium*; e *S. intercalatum*. Dentre estas, apenas o *S. mansoni* está presente no Brasil, onde determina uma infecção denominada esquistossomose mansônica (CHITSULO et al., 2000; GRYSEELS et al. 2006).

No Brasil, a esquistossomose mansônica é uma doença de notificação compulsória que atinge aproximadamente 6 milhões de indivíduos, sendo que 25 milhões de pessoas vivem sob o risco de contraí-la (AMARAL et al., 2006; BRASIL, 2010). As regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste são as mais afetadas pela doença, com áreas focais e endêmicas abrangendo 19 unidades federativas. Dentre estas, Minas Gerais se destaca devido às elevadas taxas de

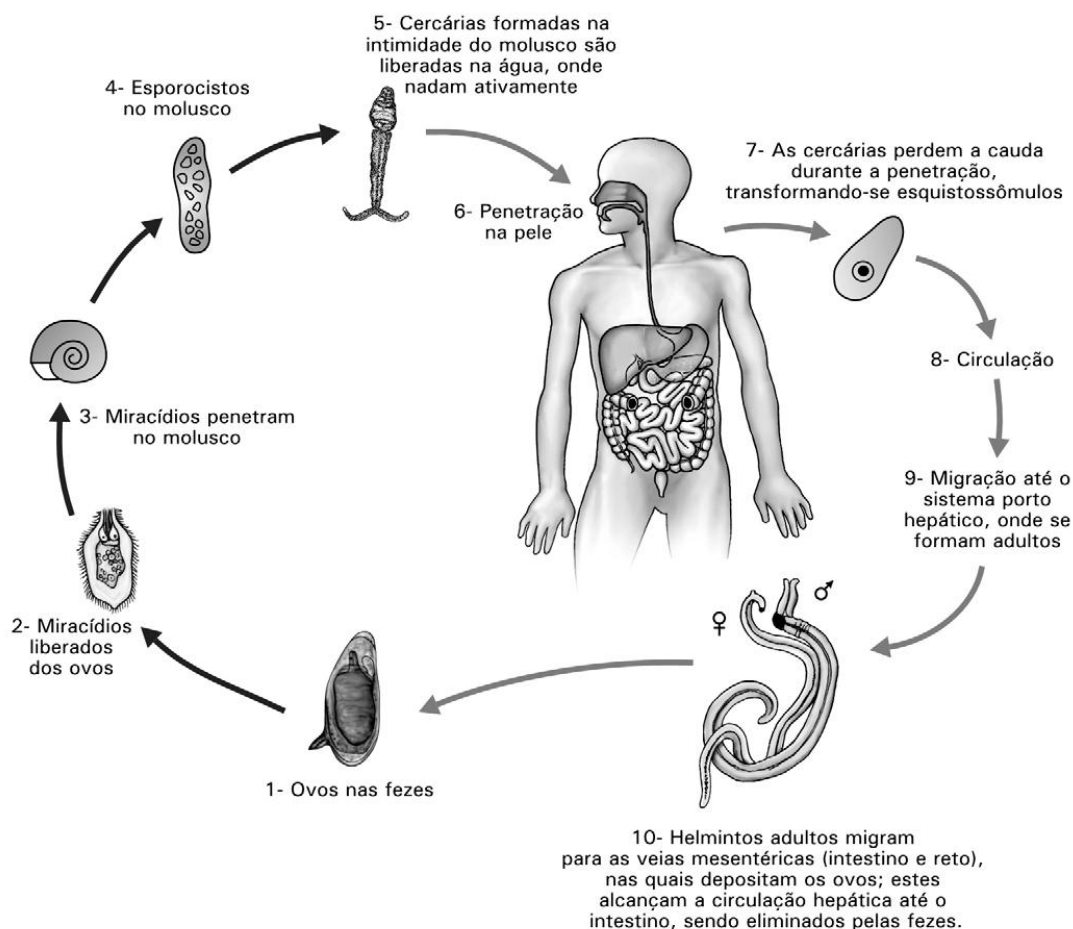
prevalência, principalmente no norte e no nordeste do Estado (FERRARI et al., 2003; BRASIL, 2010).

A esquistossomose mansônica é transmitida principalmente pelo caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae), a mais estudada devido sua ampla distribuição geográfica e suscetibilidade pelo parasito (MORGAN et al., 2001).

O *S. mansoni* adulto é um helminto delgado e longo, que possui como característica primordial o marcado dimorfismo sexual. Os machos são menores (cerca de 1 cm), esbranquiçados e apresentam tegumento recoberto por minúsculos espinhos e tubérculos. Enquanto as fêmeas são maiores (1,5 cm), mais escuras e com tegumento liso. No sentido longitudinal dos corpos dos machos existem duas dobras laterais que formam uma cavidade central chamada de canal ginecóforo, cuja finalidade é albergar e fecundar as fêmeas (MACHADO-SILVA et al., 2008; MELO & COELHO, 2005).

Este parasito possui um ciclo de vida complexo, diferenciando-se de acordo com os estágios em que se encontra devido a sua grande capacidade de adaptação, multiplicação e resistência (IBIKOUNLÉ et al., 2012; SIMÕES, 2005).

Em síntese, os ovos produzidos por vermes adultos são liberados pelas fezes na água, onde amadurecem e liberam os miracídios, os quais infectam os caramujos. No interior dos caramujos, os miracídios são transformados em esporocistos por reprodução assexuada, dando origem às cercárias, que são liberadas na água. Estas por sua vez, penetram, através da pele, no hospedeiro definitivo e, ao se transformarem em esquistossômulos, migram para a circulação hepatoportal, onde amadurecem em vermes adultos machos e fêmeas. Após o acasalamento, os pares de vermes adultos se movem contra a corrente sanguínea e ao atingirem os capilares das paredes intestinais depositam seus ovos, os quais são responsáveis pela lesão imunopatológica (KUNZ, 2001; SOUZA et al., 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Fonte: SOUZA et al., 2011.

Assim, os machos precisam ser robustos e possuir musculatura desenvolvida para vencer a força da corrente sanguínea e as fêmeas constituição delgada para atingir os vasos capilares e otimizar a oviposição (PLATT & BROOKS, 1997).

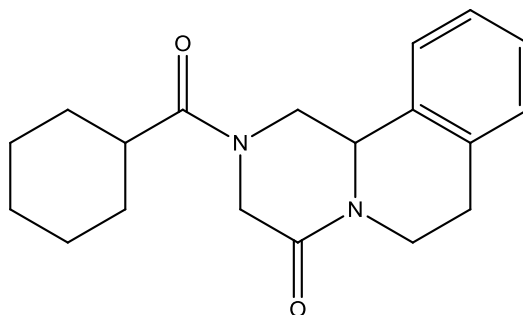
Outra característica marcante dos vermes adultos de *S. mansoni* é o tegumento que lhe serve de revestimento, nutrição, evasão imune, modulação, excreção, osmorregulação, recepção sensorial e transdução de sinais (HOCKLEY, 1973; MORAES, 2012a).

Devido à importância do tegumento, pesquisadores tem se dedicado ao estudo proteômico da superfície tegumentar dos parasitos adultos. Neste contexto, estudos culminaram na purificação e caracterização da enzima ATP-difosfohidrolase, presente na superfície externa do tegumento de *S. mansoni*. Tendo em vista a importância do ADP no processo de ativação plaquetária, foi proposto que esta enzima, a ATP-difosfohidrolase, poderia participar do mecanismo de escape do parasito à resposta do hospedeiro clivando ATP ou ADP, os quais poderiam ser liberados por plaquetas ativadas ou linfócitos T

citotóxicos (FARIA-PINTO et al., 2004, 2008; VASCONCELOS et al., 2008). Assim, a descoberta de inibidores desta enzima pode constituir um dos possíveis mecanismos de ação de substâncias esquistossomicidas.

Em relação ao tratamento da esquistossomose, a quimioterapia associada ao saneamento básico e à educação sanitária constituem as formas mais eficazes no controle desta helmintose, devido ao fato de ainda não haver vacina (ABDUL-GHANIET al., 2009). Com relação à quimioterapia, atualmente o único medicamento recomendado para o tratamento regular da doença é o Praziquantel (PZQ, Figura 2), o qual atende aos requisitos estabelecidos pela OMS, estando incluído na lista de medicamentos essenciais eleitos por essa entidade (OMS, 2013).

O PZQ, derivado pirazinoisoquinoleínico, foi o primeiro fármaco a apresentar acentuada atividade, por via oral ou intramuscular, contra todas as espécies de *Schistosoma* que acometem o ser humano (CIOLI et al., 1995; GÖNNERT & ANDREWS, 1977). Entretanto, este medicamento possui baixa eficácia frente às formas imaturas do parasito e, além disso, já há relatos de resistência ao PZQ (ARAÚJO, 2010; FALLON et al., 1995; ISMAIL et al., 1994, 1996; PICQUET et al., 1998).



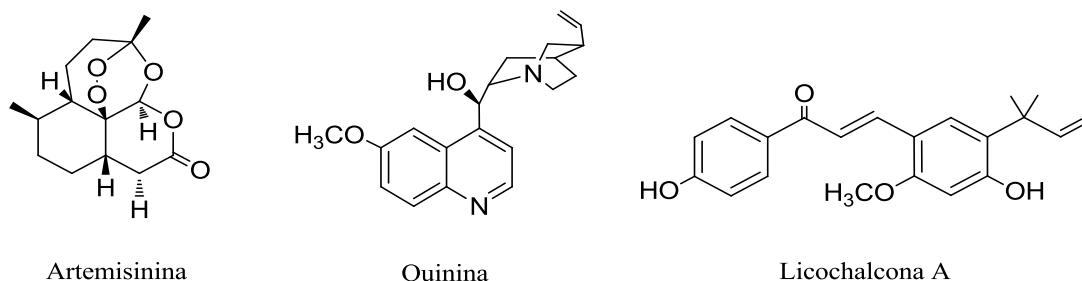
**Figura 2.** Estrutura química do Praziquantel

A confirmação, por meio de evidências científicas, da existência de linhagens de *Schistosoma* resistentes ao agente esquistossomicida supracitado, aliado ao baixo interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de fármacos para tratamento desta doença negligenciada, reforça a necessidade de pesquisas para a descoberta de novos fármacos para a prevenção e a cura da esquistossomose (MORAES et al., 2012a; PICCA-MATTOCIA et al., 1993).

## 1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS

Diversas pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais com o objetivo de encontrar substâncias que possam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários (DA SILVA FILHO et al., 2009; DE CASTRO et al., 2013; KAISER et al., 2003; NEWMAN & CRAGG., 2012). Como exemplo de fármacos antiparasitários, oriundos de fontes naturais, temos a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica obtida das folhas de *Artemisia annua* (Asteraceae), e a quinina, um alcalóide quinolínico, obtida das cascas da Quina (*Cinchona sp.*, Rubiaceae) (Figura 3), ambas utilizadas no tratamento da malária (ACHAN et al., 2011; MAKANGA & KRUDSOOD, 2009).

Já a licochalcona A (Figura 3), uma chalcona obtida das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae), demonstrou expressiva atividade leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major* (ZHAI et al., 1995).



**Figura 3.** Substâncias, obtidas de plantas, com atividade antiparasitária.

Em decorrência da grande importância dos produtos naturais no processo de descoberta de novas substâncias antiparasitárias, pesquisadores têm se dedicado às pesquisas com plantas medicinais na busca de extratos vegetais ou metabólitos ativos promissores, os quais possam ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (DE CASTRO et al., 2013; KAISER et al., 2003; RAMALHETE et al., 2012).

Neste contexto, estudos demonstraram a atividade cercaricida de óleos essenciais, como por exemplo, de *Piper cubeba* (Piperaceae), *Piper marginatum* (Piperaceae), *Capsicum annuum* (Solanaceae) e *Apium graveolens* (Apiaceae) (FRISCHKORN et al., 1978;

---

MAGALHÃES et al., 2012; SALEH. et al., 1985). Além disso, alguns óleos essenciais também demonstraram atividade *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*, como os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), *Bidens sulphurea* (Asteraceae), *Tagetes erecta* (Asteraceae), *Piper cubeba* (Piperaceae) e *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) (AGUIAR et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; DE MELO et al., 2011; PARREIRA et al., 2010; TONUCCI et al., 2012;).

Diversos extratos brutos vegetais, de diferentes espécies de plantas, também têm sido avaliados a partir de estudos de triagem, *in vitro*, frente a vermes adultos de *S. mansoni* com o intuito de descobrir espécies vegetais com potenciais atividades esquistossomicidas (DE CASTRO, et al., 2013). Como exemplo desta busca, temos o estudo realizado por YOUSIF e colaboradores (2007) que identificaram, dentre 346 extratos metanólicos de diferentes espécies, promissora atividade esquistossomicida *in vitro* para os extratos de *Pinus canariensis* (Pinaceae), *Agave lophanta* (Agavaceae), *Furcraea selloa* (Agavaceae) e *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae).

Em 2011, KONÉ e colaboradores também realizaram uma triagem, *in vitro*, dos extratos de diversas plantas medicinais frente aos esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni*. Vários extratos avaliados demonstraram potencial atividade esquistossomicida, em especial o extrato hidroalcoólico das folhas de *Flabellaria paniculata*, o qual foi capaz de causar a morte de 100% dos parasitos na concentração de 20 µg/mL.

Já em 2013, CARRARA e colaboradores avaliaram a atividade esquistossomicida *in vitro* dos extratos aquosos e diclorometânicos das folhas e galhos de 7 espécies de *Piper*. Dentre estes, os extratos diclorometânicos das folhas de *P. aduncum* e *P. amalago*, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram expressiva atividade esquistossomicida após 24 h de incubação.

Assim, os extratos brutos com boa atividade esquistossomicida podem ser submetidos ao fracionamento e isolamento de seus constituintes, com o intuito de identificar substâncias ativas promissoras (CHITWOOD, 2002; DE CASTRO et al., 2013).

Neste contexto, alguns estudos foram direcionados para a avaliação da atividade de metabólitos secundários frente ao *S. mansoni*. Por exemplo, a pipartina, piperamida isolada de *Piper tuberculatum* (Piperaceae), demonstrou elevada atividade esquistossomicida *in vitro*, sendo capaz de, em baixas concentrações (15,8 µM), provocar a morte de todos os vermes adultos de *S. mansoni* (MORAES et al., 2011a).

Igualmente à pipartina, a metilcubebina, também isolada de uma espécie de *Piper* (*P. cubeba*) apresentou expressiva atividade esquistossomicida, sendo capaz de matar 100% dos parasitos após 24 h de incubação na concentração de 10 µM (Patente PI 0503951-7).

Da mesma forma, MAGALHÃES e colaboradores (2010) avaliaram a atividade de alguns derivados de floroglucínóis, obtidos de espécies de *Dryopteris* (Dryopteridaceae), frente a vermes adultos de *S. mansoni* e observaram que todos os vermes foram mortos após 24 horas de incubação.

Já PEREIRA e colaboradores (2011) avaliaram a atividade esquistossomicida dos enantiômeros (-) e (+) de licarina-A, uma neolignana diidrobenzofurânica, obtida de espécies de *Licaria* sp. A mistura racêmica e o enantiômero (-) da licarina-A demonstraram significativa atividade esquistossomicida *in vitro*, enquanto o enantiômero (+)-licarina-A foi pouco ativo.

Assim, tendo em vista a atividade esquistossomicida *in vitro* de óleos essenciais, extratos brutos e substâncias isoladas provenientes de espécies de *Piper* (CARRARA et al., 2013; MORAES et al., 2011b; MAGALHÃES et al., 2012; Patente PI 0503951-7), estas espécies podem ser consideradas de grande importância para a obtenção de extratos ou substâncias ativas frente ao *Schistosoma*. Sendo assim, estudos fitoquímicos, associados a ensaios esquistossomicidas, com extratos brutos e metabólitos isolados de espécies de *Piper* podem ser promissores no intuito de encontrar novas moléculas ativas frente ao *S. mansoni* (DE CASTRO et al., 2013).

### 1.3 FAMÍLIA PIPERACEAE

A família Piperaceae, pertence à ordem Piperales, constitui uma das mais primitivas famílias entre as Angiospermas (WANKE et al., 2007). É uma família predominantemente tropical que compreende atualmente quatro gêneros: *Piper*, *Piperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*, sendo os dois primeiros os mais representativos com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente (MABBERLEY 1997; SOUZA 2005).

Esta família é comumente encontrada nas formações florestais brasileiras, principalmente na Mata Atlântica, onde as espécies de *Piper* são detectadas com mais frequência. No Brasil, há cerca de 450 espécies da família Piperaceae, sendo 265 espécies de *Piper* e 166 de *Peperomia* (REIGADA, 2009).

## 1.4 GÊNERO *Piper*

As espécies do gênero *Piper*, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, são usadas na medicina popular como anti-inflamatório, antipirético, inseticida e no tratamento da asma e de dores de estômago, entre outros usos (PARMAR et al., 1997).

A composição química das espécies de *Piper* tem sido investigada, culminando na identificação de diferentes classes de metabólitos secundários, tais como: alcaloides, chalconas (PARMAR et al., 1997; ORJALA et al., 1994), fenilpropanoides (BENEVIDES et al., 1999), lignanas e neolignanas (CHAURET et al., 1996; MARTINS et al., 2003), ácidos benzóicos prenilados, cromenos (BALDOQUI et al., 1999; DÍAZ et al., 1987; LAGO et al., 2009; MOREIRA et al., 1998; ORJALA et al., 1993), e terpenos (PARMAR et al., 1997).

Entretanto, de acordo com DYER & PALMER (2004), apenas 10% das espécies de *Piper* foram investigadas. Entre as espécies de grande interesse medicinal do gênero *Piper*, está a *P. aduncum* L.

## 1.5 *Piper aduncum* L.

*Piper aduncum* L., popularmente conhecida como “pimenta-de-macaco” e “apertaruão”, é uma planta de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos (SOUSA et al., 2008). Esta espécie, de elevada resistência às mudanças climáticas, é considerada oportunista por invadir áreas desflorestadas (RALI et al., 2007; SOUSA et al., 2008).

Esta espécie é um arbusto (Figura 4) que possui em toda sua extensão odor e sabor picante, podendo crescer até uma altura de cerca de 6 m, com ramos pubescentes e folhas com pecíolo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento, sem bainha. Possui folhas elípticas ou lanceoladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento e 7 cm de largura. As espigas são regularmente curvadas, de tamanho semelhante ao das folhas com pedúnculos curtos, bractéolas pedicelado-peltadas, com pelta provida de pelos, quatro estames e três estigmas sésseis (LEPS et al., 2002; RALI et al., 2007)





**Figura 4.** Foto das partes aéreas de *Piper aduncum* L. **Fonte:** autora

As partes aéreas de *P. aduncum* L. são usadas popularmente como diurético, carminativo, cicatrizante, anti-hemorrágico, inseticida, antisséptico, e anti-inflamatório. Além disso, são usadas para o tratamento de doenças ginecológicas, úlceras crônicas, erisipelas, distúrbios intestinais e hepáticas (NAVICKIENE et al., 2006; ORJALA et al., 1994; RALI et al., 2007; SOUSA et al., 2008).

O óleo essencial de *P. aduncum* L. é constituído por monoterpenos (como: limoneno, piperitona, pineno e linalol), sesquiterpenos (como: cariofileno, nerolidol e aromadrendreno) e fenilpropanoides (principalmente o dilapiol e o safrol), sendo que a porcentagem de cada constituinte no óleo pode variar de acordo com as condições edafoclimáticas de cada região e época do ano (FAZOLIN et al., 2005; MAIA et al., 1998; MESQUITA et al., 2005; NAVICKIENE et al., 2006; RALI et al., 2007; VILA et al., 2005).

Estudos científicos têm revelado potenciais usos biológicos do óleo essencial extraído de *P. aduncum* L., como por exemplo, no combate do *Aedes aegypti*, vetor transmissor da dengue (MISNI et al., 2011; RAFAEL et al., 2008), e de várias pragas agrícolas, como *Colletotricum musae* e *Cladosporium cladosporioides* (ARAÚJO et al., 2012; BASTOS & ALBUQUERQUE, 2004; FAZOLIN et al., 2005, 2007, NAVICKIENE et al., 2006; SILVA et al., 2007, 2009).

Além da atividade biológica do óleo essencial de *P. aduncum* L., os extratos brutos desta espécie também têm despertado grande interesse dos pesquisadores. Como exemplo, temos o trabalho de POHLIT e colaboradores (2004) que demonstraram a atividade inseticida

do extrato metanólico das folhas e raízes de *P. aduncum* L. sobre larvas de *Aedes aegypti*. Já o estudo realizado por MULLER (2011) evidenciou a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos das folhas e caules de *P. aduncum* L. frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*.

Em continuidade, RAPADO e colaboradores (2011) observaram que o extrato bruto das partes aéreas de *P. aduncum* L., possui atividade moluscicida frente ao *B. glabrata*, o hospedeiro intermediário do *S. mansoni*.

Diante a necessidade de se buscar preparações vegetais com potencial atividade esquistossomicida, CARRARA e colaboradores (2013) demonstraram que o extrato diclorometânico das folhas de *P. aduncum*, na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de matar 75% dos vermes adultos de *S. mansoni* após 24 h de incubação. Entretanto, o extrato diclorometânico dos galhos e os extratos aquosos, tanto das folhas quanto dos galhos, não foram capazes de causar qualquer tipo de alteração nos parasitos.

Com relação ao isolamento e a identificação de metabólitos secundários com potenciais atividades biológicas (Tabela 1), TORRES-SANTOS e colaboradores (1999) isolaram e purificaram do extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L. a chalcona **1** (Tabela 1), conhecida como pinostrobin chalcona, a qual possui significativa atividade *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Já a diidrochalcona, (substância **5**, Tabela 1), isolada do extrato etanólico das folhas de *P. aduncum* L., possui atividade anticancerígena, com seletividade pelas células tumorais de melanoma (TOMIO, 2011).

Além disso, a partir de um estudo bioguiado, realizado com o extrato diclorometânico bruto das folhas de *P. aduncum* L., ORJALA e colaboradores (1994), isolaram e identificaram algumas diidrochalconas (**5 a 9**) (Tabela 1). Os resultados das atividades biológicas para estes metabólitos evidenciaram moderado efeito citotóxico das diidrochalconas **7 e 8** sobre as células de carcinoma de nasofaringe, além de expressiva atividade moluscicida da diidrochalcona **6** frente ao *B. glabrata* e atividade antibacteriana de todas as diidrochalconas identificadas (**5-9**) frente ao *Bacillus subtilis* e ao *Micrococcus luteus*.

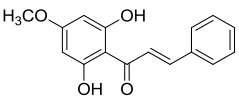
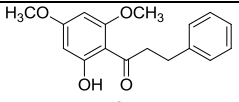
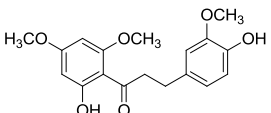
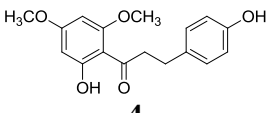
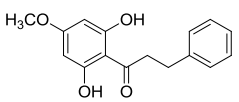
Semelhantemente, LAGO e colaboradores (2009) também realizaram um estudo bioguiado, utilizando os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, que

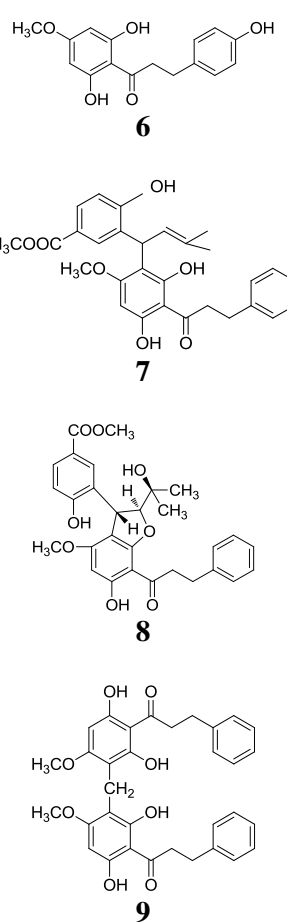
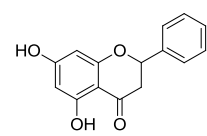
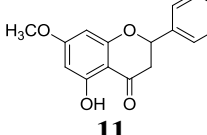
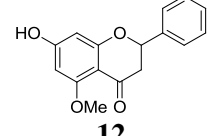
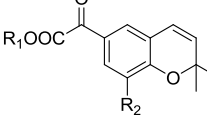
culminou no isolamento da substância ativa 5,7-dihidroxi-flavanona (**10**, Tabela 1), conhecida como pinocembrina.

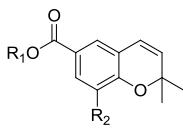
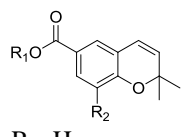
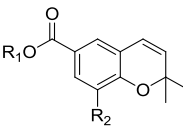
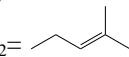
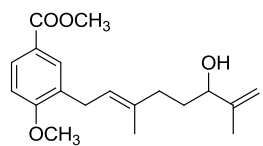
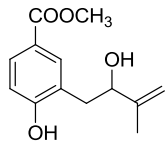
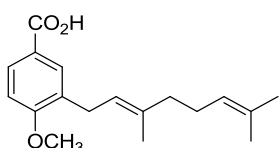
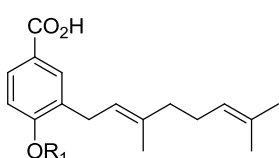
Outra importante classe de metabólito secundário encontrado nas partes aéreas de *P. aduncum* L. são os cromenos (substâncias: **13-19**, Tabela 1) (BALDOQUI et al., 1999; BATISTA Jr. et al., 2008; ORJALA et al., 1993). O cromeno **19** demonstrou atividade frente às formas epimastigotas de *Tripanossoma cruzi* (BATISTA Jr. et al., 2008), enquanto os cromenos **14** e **15** apresentam atividade moluscicida sobre o *B. glabrata* (ORJALA et al., 1993).

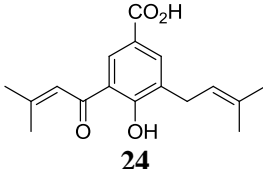
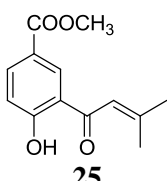
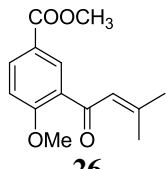
Da mesma forma, derivados do ácido benzoico também já foram isolados de *P. aduncum* L. sendo que, os derivados **22** e **23** (Tabela 1) apresentam atividade antiparasitária (FLORES et al., 2009), enquanto **20** e **21** apresentaram atividade antimicrobiana (ORJALA et al., 2003).

**Tabela 1.** Metabólitos secundários fixos isolados de *P. aduncum* L.

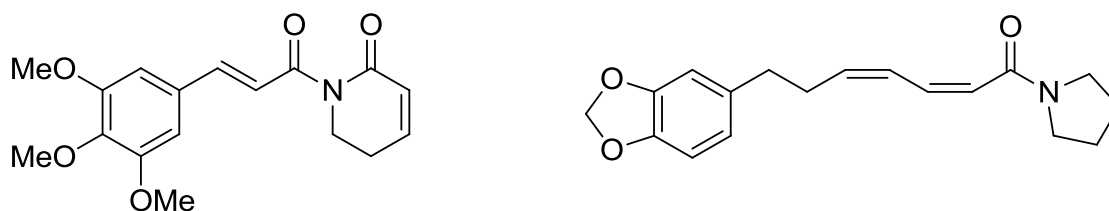
Estrutura	Parte da Planta	Atividade <i>in vitro</i>	Referências
<b>CHALCONAS</b>			
 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	Inflorescências	Leishmanicida	MOREIRA et al., 1998 TORRES-SANTOS et al., 1999
<b>DIIDROCHALCONAS</b>			
 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	Inflorescências	-----	MOREIRA et al., 1998
 <p style="text-align: center;"><b>3</b></p>			
 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>			
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	Inflorescências	Antitumoral Antibacteriana	BURKE & NAIR, 1986 MOREIRA et al., 1998 ORJALA et al., 1994 MORANDI et al., 1998 BALDOQUI et al., 1999 TOMIO, 2010 MULLER, 2011
	Folhas		

 <p><b>6</b></p> <p><b>7</b></p> <p><b>8</b></p> <p><b>9</b></p>	<p>Folhas</p>	<p>Antibacteriana</p> <p>-----</p> <p>Moluscicida do composto <b>6</b> frente ao <i>Biomphalaria glabrata</i></p> <p>-----</p> <p>Citotóxica dos compostos <b>7</b> e <b>8</b> frente às células KB</p>	<p>ORJALA et al., 1994</p>
<b>FLAVANONAS</b>			
 <p><b>10</b></p>	<p>Folhas</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>LAGO et al., 2009</p>
 <p><b>11</b></p>	<p>Inflorescências</p>	<p>-----</p>	<p>BURKE &amp; NAIR, 1986</p>
 <p><b>12</b></p>	<p>Inflorescências</p>	<p>-----</p>	<p>MOREIRA et al., 1998</p>
<b>CROMENOS</b>			
 <p><b>13: R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H,</b></p>	<p>Folhas</p>	<p>Antibacteriana e Moluscicida frente ao <i>Biomphalaria glabrata</i>, substâncias <b>14</b> e <b>15</b></p>	<p>ORJALA et al., 1993</p>

<p><b>14:</b> R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  <b>15:</b> R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH</p>  <p><b>13:</b> R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H  <b>14:</b> R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH  <b>15:</b> R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H  <b>16:</b> R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= CH<sub>2</sub> CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></p>	Folhas	Antitumoral frente linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BALDOQUI et al., 1999
 <p><b>16:</b> R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H,  <b>17:</b> R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H  <b>18:</b> R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH</p>	Folhas	Tripanocida	BATISTA Jr. et al., 2008
 <p><b>19:</b> R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= </p>	Caules Folhas	Tripanocida	MOREIRA et al., 1998 BATISTA Jr. et al., 2008
<b>DERIVADOS DO ÁCIDO BENZOICO</b>			
 <p><b>20</b></p>  <p><b>21</b></p>	Folhas	Antimicrobiana	ORJALA et al., 1993
 <p><b>22</b></p>	Folhas	Antitumoral contra linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BALDOQUI et al., 1999
	Folhas	Leishmanicida Tripanocida	FLORES et al., 2009

<p><b>22:</b> R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; <b>23:</b> R<sub>1</sub> = H</p>  <p><b>24</b></p>			
 <p><b>25</b></p>  <p><b>26</b></p>	<p>Caules Folhas</p>	<p>Antimicrobiana (inativas)</p>	<p>Muller, 2011</p>

Considerando a necessidade de se encontrar moléculas naturais com promissora atividade esquistossomicida, evidências científicas demonstram a atividade *in vitro*, frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, para os extratos brutos de *P. tuberculatum* e de *P. amalago*, os quais, após fracionamento cromatográfico, resultaram no isolamento de duas amidas (Figura 5), ambas com expressiva atividade esquistossomicida (MORAES et al., 2011a; CARRARA et al., 2013).



**Figura 5.** Amidas isoladas de espécies de *Piper*.

Considerando a espécie *P. aduncum*, estudo de avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos aquosos e diclorometânicos das folhas e galhos de sete espécies de *Piper*, realizado por nosso grupo de pesquisas, evidenciou que o extrato diclorometânico bruto das folhas de *P. aduncum* possui elevada atividade (CARRARA et al., 2013), o que despertou grande interesse nesta espécie.

Tendo em vista o potencial esquistossomicida de *P. aduncum*, esta espécie foi selecionada para produção de extratos e avaliação da atividade esquistossomicida destes. Triagem esquistossomicida inicial, realizada por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que o extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum*, na concentração de 200 µg/mL, foi capaz de matar 100% dos vermes adultos de *S. mansoni* após 24 h de incubação (dados não publicados).

Assim, este extrato ativo foi escolhido para a realização deste estudo, já que além do caráter inédito da avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*, tanto do extrato bruto, quanto de substâncias isoladas das inflorescências de *P. aduncum*, há ainda uma carência de estudos fitoquímicos e biológicos sobre as inflorescências de *P. aduncum* em detrimento aos estudos relacionados com as folhas desta espécie.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato diclorometânico bruto, das frações orgânicas e das substâncias isoladas das inflorescências de *P. aduncum* L., visando encontrar moléculas e/ou protótipos naturais com potencial esquistossomicida.

Para estes propósitos, os objetivos específicos do estudo foram:

- Obter o extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L.;
- Realizar o estudo fitoquímico do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L., por meio do isolamento, purificação e identificação das principais substâncias presentes neste extrato;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato diclorometânico bruto, frações e metabólitos majoritários isolados e identificados das inflorescências de *P. aduncum* L.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS CROMATOGRÁFICOS

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

- Aparelho de Soxhlet com manta aquecedora *Marconi*
- Rotaevaporador RII *Buchi*
- Bomba V-700 *Buchi*
- Balança AY220 *Marte*
- Câmara U.V. SL-204 ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm)

As análises espectroscópicas foram realizadas no Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFJF, o qual disponibilizou o espectrômetro BRUKER AVANCE DRX/300, operado em 300 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) e 75 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

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

- para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (*Merck*).

- para cromatografia líquida à vácuo (CLV) utilizaram-se como adsorventes sílica gel 60H (partículas menores que 55  $\mu\text{m}$ , *Merck*) e sílica gel 60 (partículas de 15-40  $\mu\text{m}$ , *Merck*), na proporção de 1:1 (m/m), empregando-se coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, contendo placa sinterizada.

- para cromatografia em coluna (CC) utilizou-se como adsorvente sílica gel (partículas de 40-63  $\mu\text{m}$ , *Aldrich*) e colunas de vidro de diferentes alturas e diâmetros.

- para cromatografia em coluna *flash* utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 (partículas de 15-40  $\mu\text{m}$ , *Merck*) empregando-se coluna de vidro com 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura.

- para o preparo das placas utilizadas na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (5-40  $\mu\text{m}$ , *Vetec*), placas de vidro 20 x 20 cm, suporte das placas de vidro e disseminador.

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

- para a extração, partições, fracionamentos e sistemas cromatográficos utilizaram-se solventes de grau P.A., das marcas *Vetec*, *Cromato Produtos Químicos LTDA*, *Quemis*, *Isofar* e *Alphatec*.

- para a obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das substâncias isoladas utilizou-se metanol deuterado (MeOD, *Cambridge Isotope Laboratories*).

### 3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em 14 de fevereiro de 2012, no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF (21°46'39.48'' S; 43°22'00.10'' O). A exsiccata do vegetal foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo 59018, identificada por Daniele Monteiro Ferreira, especialista em Piperaceae e doutoranda em Botânica pela Escola Nacional de Botânica Tropical.

### 3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS INFLORESCÊNCIAS DE *P. aduncum* L.

Após a seleção das inflorescências, o material vegetal foi seco em temperatura ambiente, durante 10 dias. Após secagem, as inflorescências foram submetidas à moagem para obtenção do pó. O pó assim obtido (160 g) foi submetido à extração por Soxhlet, em diclorometano, por um período de 5 h.

A solução diclorometânica foi filtrada e, em seguida, transferida progressivamente para balão de fundo redondo e concentrada com auxílio de rotaevaporador à temperatura de  $45 \pm 5$  °C. O extrato obtido foi transferido para um frasco de boca larga, previamente pesado, e mantido aberto para a completa evaporação do solvente orgânico até a obtenção de peso constante. Após estes procedimentos, foram obtidos 24 g do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI**).

### 3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETÂNICO BRUTO DAS INFLORESCÊNCIAS UTILIZANDO PROCESSO DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

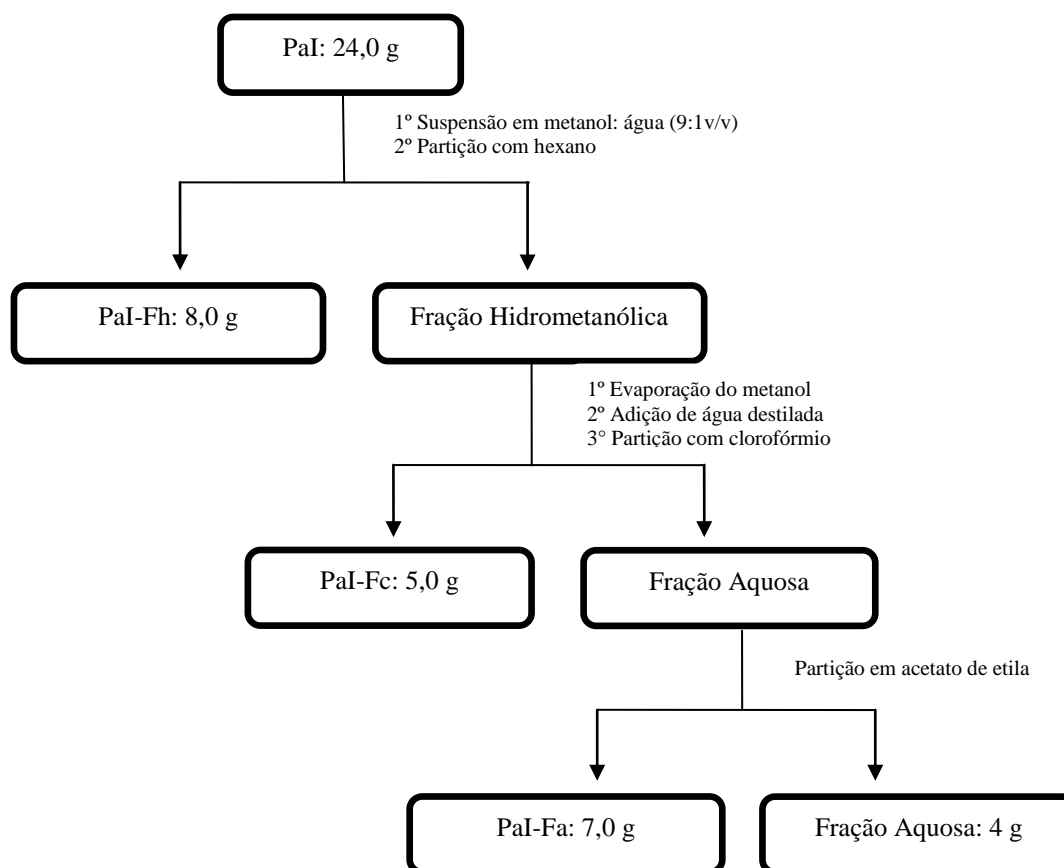
O extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. foi inicialmente submetido às partições líquido-líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades, com a finalidade de separação inicial dos constituintes do extrato, por meio da diferença de solubilidade de cada componente nas fases, conforme descrito a seguir.

Cada 1 g do extrato foi ressuspenso em 10 mL da mistura de metanol-água (9:1 v/v). Assim, esta suspensão foi transferida para funil de separação e extraída com hexano por processo de partição líquido-líquido. A partição foi realizada até a clarificação das soluções hexânicas finais. Após adição de sulfato de sódio anidro para eliminação da água, as soluções hexânicas foram filtradas para um balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida à 40 °C, sendo em seguida transferidas para frasco previamente pesado e denominada fração hexânica das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI-Fh**) (8 g).

A suspensão hidrometanólica restante foi rotaevaporada até a eliminação do metanol e, em seguida, adicionada de água destilada e particionada com clorofórmio. Às soluções clorofórmicas obtidas foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação da água e, estas soluções foram filtradas para um balão de fundo redondo e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40 °C, sendo em seguida transferidas para frasco previamente pesado e denominada fração clorofórmica das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI-Fc**) (5 g).

A solução aquosa remanescente foi particionada em acetato de etila. Após adição de sulfato de sódio anidro e filtração, estas soluções em acetato de etila foram transferidas, progressivamente, para um balão de fundo redondo, sendo concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40 °C. Após transferência para frasco previamente pesado, foi denominada fração em acetato de etila das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI-Fa**) (7 g). A fração aquosa restante foi congelada.

O processo de fracionamento do extrato bruto e as massas obtidas estão resumidos na Figura 6.



**Figura 6.** Diagrama geral do procedimento de partição líquido/líquido do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L.

No intuito de selecionar uma das frações para dar continuidade ao processo fitoquímico, estas foram avaliadas quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

De acordo com os resultados descritos no item 4.2.1, a fração clorofórmica (**PaI-Fc**), por apresentar melhor atividade esquistossomicida *in vitro*, foi selecionada para dar prosseguimento ao estudo fitoquímico.

### 3.5 ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS DE *P. aduncum* L.

#### 3.5.1 Estudo da PaI-Fc

No intuito de isolar seus constituintes, 5 g da fração **PaI-Fc** foi submetida à CLV de 10 cm de diâmetro por 7,5 cm de altura, empacotada com 300 g de sílica gel, utilizando-se

como eluentes solventes e misturas de solventes com polaridades crescentes, sendo coletadas 14 frações de 1500 mL cada. Após análise das frações, por meio de CCD, foi possível agrupá-las em 12, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Frações obtidas por CLV da fração **PaI-Fc**.

<b>Eluentes</b>	<b>Frações</b>	<b>Massas (g)</b>
Hex 100%	PaI-Fc-C1	0,015
Hex:AcOEt 5% e 10%	PaI-Fc-C2 e 3	0,041
Hex:AcOEt 15%	PaI-Fc-C4	0,043
Hex:AcOEt 20%	PaI-Fc-C5	0,150
Hex:AcOEt 30%	PaI-Fc-C6	0,341
Hex:AcOEt 45% e 70%	PaI-Fc-C7 e 8	1,468
AcOEt 100%	PaI-Fc-C9	0,395
AcOEt:MeOH 10%	PaI-Fc-C10	0,784
AcOEt:MeOH 30%	PaI-Fc-C11	0,339
AcOEt:MeOH 50%	PaI-Fc-C12	0,406
AcOEt:MeOH 70%	PaI-Fc-C13	0,153
MeOH 100%	PaI-Fc-C14	0,100
<b>TOTAL</b>		<b>4,235</b>

### 3.5.1.1 Fração **PaI-Fc-C5**

Dando prosseguimento ao processo de purificação, a fração **PaI-Fc-C5** (0,150 g) foi submetida à CC de 2,5 cm de diâmetro e 27 cm de altura, empacotada com 60 g de sílica gel. A eluição foi realizada com mistura de clorofórmio: acetona com polaridades crescentes, obtendo-se 41 sub-frações de 50 mL cada, as quais foram reagrupadas em 9 subfrações após análise por CCD, conforme descrito na Tabela 3. Após análise cromatográfica, observou-se que uma subfração apresentou uma única mancha, nas condições cromatográficas analisadas. Esta subfração isolada, codificada como **PaI-Fc-C5** <sub>(10-14)</sub>, foi submetida à análise espectroscópica para a identificação de sua estrutura química.

**Tabela 3.** Frações obtidas por CC da fração **PaI-Fc-C5**.

Eluentes	Frações	Massas (g)
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (1 e 2)	0,020
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (3)	0,010
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (4)	0,015
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (5)	0,010
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (6)	0,015
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (7-9)	0,020
<b>CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 3%</b>	<b>PaI-Fc-C5 (10-14)</b>	<b>0,030</b>
CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C5 (15-21)	0,010
CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO 5% →100%	PaI-Fc-C5 (22-41)	0,015
<b>TOTAL</b>		<b>0,145</b>

### 3.5.1.2 Fração PaI-Fc-C6

Em continuidade ao estudo fitoquímico, a fração **PaI-Fc-C6** (0,341 g), foi submetida a CC, utilizando coluna de vidro de 4 cm de diâmetro por 26 cm de altura empacotada com 137 g de sílica gel. Foram coletadas 48 frações de 50 ml cada, utilizando-se como eluentes clorofórmio: acetona: metanol em diferentes concentrações. Após análise em CCD as frações foram reunidas em 10 subfrações (Tabela 4). Após análise cromatográfica, observou-se que das 10 subfrações 2 apresentaram uma única mancha, nas condições cromatográficas analisadas. Estas subfrações isoladas, codificadas como **PaI-Fc-C6** (26-29) e **PaI-Fc-C6** (30-35), foram submetidas à análise espectroscópica para a identificação de suas estruturas químicas.

**Tabela 4.** Frações obtidas por CC da fração **PaI-Fc-C6**

Eluentes	Frações	Massas (g)
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C6 (1-3)	0,015
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C6 (4-6)	0,030
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C6 (7 e 8)	0,015
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3%	PaI-Fc-C6 (9-15)	0,045
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 3% →5%	PaI-Fc-C6 (16-25)	0,040
<b>CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 5%</b>	<b>PaI-Fc-C6 (26-29)</b>	<b>0,015</b>
<b>CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 5 →10%</b>	<b>PaI-Fc-C6 (30-35)</b>	<b>0,016</b>
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 10→50%	PaI-Fc-C6 (36-41)	0,080
AcOEt 100%	PaI-Fc-C6 (42-44)	0,050
AcOEt:MeOH 70%	PaI-Fc-C6 (45-48)	0,025
<b>TOTAL</b>		<b>0,331</b>

### 3.5.1.3 Fração PaI-Fc-C7 e C8

Ainda, a fração **PaI-Fc-C7 e C8** (1,468 g) foi aplicada em coluna *flash* de vidro de 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura empacotada com 180 g de sílica gel, da qual foram coletadas 107 frações de 50 mL cada, utilizando os eluentes clorofórmio: acetona e acetato de etila: metanol em gradiente de polaridade. Após análise da CCD as frações foram reunidas em 19 subfrações (Tabela 5).

**Tabela 5.** Subfrações obtidas por meio de coluna *flash* da fração **PaI-Fc-C7 e C8**

Eluentes	Frações	Massas (g)
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(1)</sup>	0,015
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(2)</sup>	0,010
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(3)</sup>	0,010
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(4)</sup>	0,002
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(5)</sup>	0,003
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(6)</sup>	0,009
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(7)</sup>	0,004
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(8)</sup>	0,009
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(9)</sup>	0,009
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 5%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(10)</sup>	0,005
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 7%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(11)</sup>	0,020
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 7%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(12)</sup>	0,050
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 7%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(13)</sup>	0,020
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 7%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(14)</sup>	0,080
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 10%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(15)</sup>	0,090
<b>CHCl<sub>3</sub>:Me<sub>2</sub>CO 10%</b>	<b>PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(16)</sup></b>	<b>0,080</b>
CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO 10% → 50%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(17)</sup>	0,730
AcOEt:MeOH 50%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(18)</sup>	0,100
MeOH 100%	PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(19)</sup>	0,206
<b>TOTAL</b>		<b>1,452</b>

Após a análise das subfrações por meio da CCD, a **PaI-Fc-C7 e C8** <sup>(16)</sup> (80 mg) foi selecionada para dar continuidade ao processo de isolamento.

#### 3.5.1.3.1 Fração PaI-Fc-C7 e C8 <sup>(16)</sup>

Dando continuidade, a **PaI-Fc-C7 e C8** <sup>(16)</sup> foi submetida à CCDP utilizando placas cromatográficas fabricadas. Em cada placa cromatográfica, no total de quatro, foi aplicada

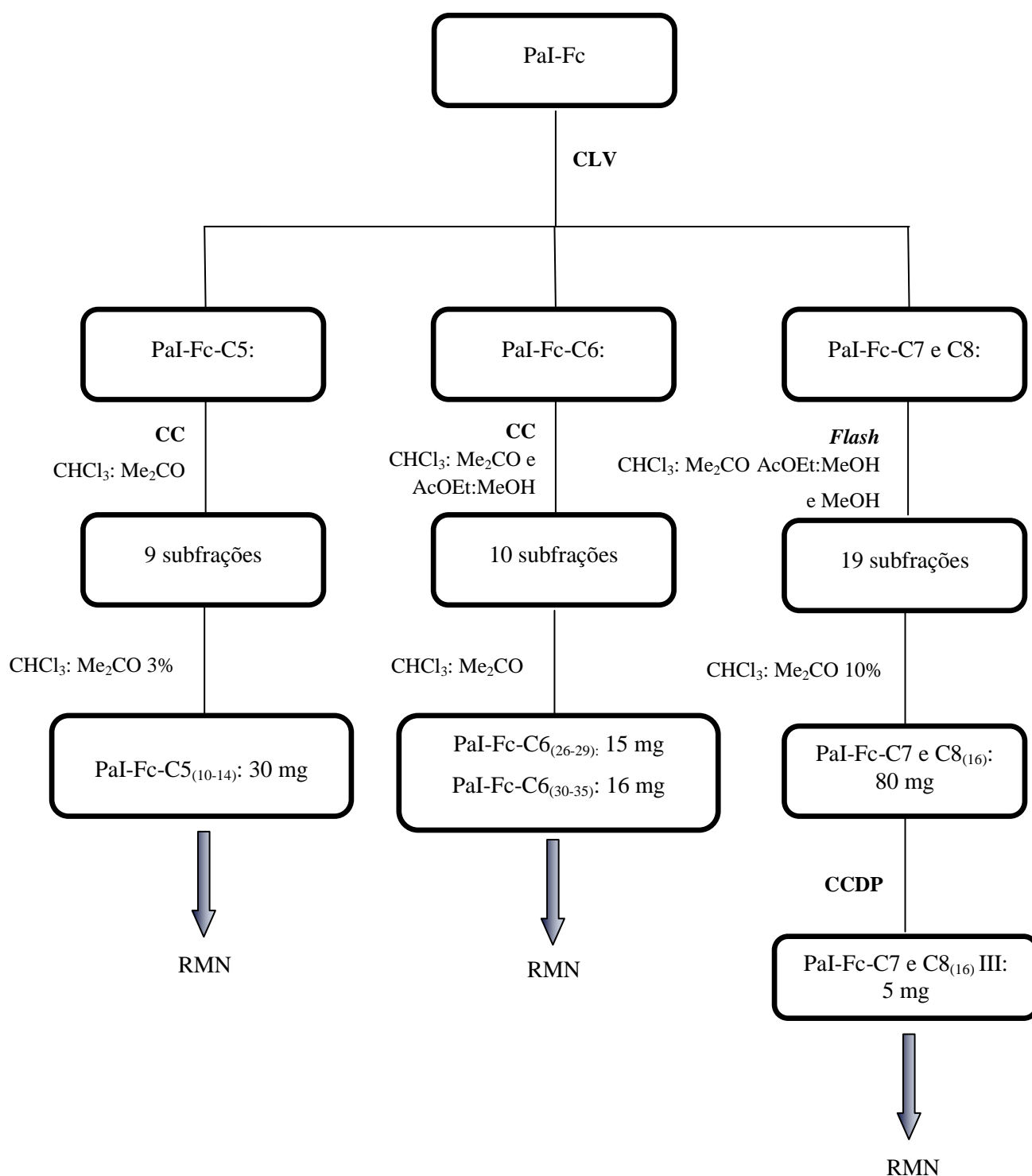
aproximadamente 20 mg da amostra solubilizada em MeOH e posteriormente, estas placas foram eluidas no sistema solvente DCM: Me<sub>2</sub>CO (85:15) acrescido de 1% de ácido acético glacial.

Após este procedimento, foram destacados, com auxílio de uma espátula metálica, os limites de cada mancha visualizada sob luz ultravioleta a 254 nm. Neste processo, foram obtidas cinco faixas, que após raspadas, foram inseridas, separadamente, em coluna cromatográfica com placa contendo placa sinterizada e lavadas com MeOH e CHCl<sub>3</sub>, no intuito de promover a dessorção das substâncias. Em seguida, o solvente foi evaporado, por meio de um rotaevaporador.

Destas cinco frações obtidas, somente a faixa codificada como **PaI-Fc-C7 e C8** <sup>(16)</sup> **III** (5 mg) apresentou, nas condições cromatográficas analisadas, uma única mancha. Assim, esta substância isolada foi submetida à análise espectroscópica para a identificação de sua estrutura química.

Os procedimentos empregados para o isolamento dos metabólitos majoritários das inflorescências de *P. aduncum* L. estão apresentados, resumidamente, na Figura 7.





**Figura 7.** Fluxograma do isolamento dos metabólitos majoritários da fração clorofórmica das inflorescências de *P. aducum* L (PaI-Fc).

### 3.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

O extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* (**PaI**), suas frações orgânicas (**PaI-Fc**, **PaI-Fh** e **PaI-Fa**) e substâncias isoladas (**PaI-Fc-C5** (10-14), **PaI-Fc-C6** (26-29) e **PaI-Fc-C6** (30-35)) foram avaliadas quanto a atividade esquistossomicida *in vitro* a frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Os ensaios esquistossomicidas preliminares foram realizados pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila de Faria-Pinto e os demais ensaios esquistossomicidas foram realizados no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, sob a coordenação e responsabilidade do Dr. Josué de Moraes e do Dr. Pedro Silva Pinto.

#### 3.6.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni*

##### 3.6.1.1 Linhagem do *S. mansoni*

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

##### 3.6.1.2 Manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni*

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com PELLEGRINO E KATZ (1968). Os hamsters infectados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada dos ovos infectados do fígado e posterior obtenção dos miracídios. Os fígados foram triturados em liquidificador em solução salina 0,85% (m/v), e a suspensão dos tecidos homogeneizados foi deixada para sedimentação no escuro. O sedimento foi suspenso com água declorada e exposto à luz para obtenção dos miracídios. O número e a viabilidade dos miracídios e cercárias foram determinados com o auxílio de um estereomicroscópio.

Para a infecção do hospedeiro intermediário, *B. glabrata*, foram utilizados 8 miracídeos por caramujo e após 35 a 40 dias, estes foram expostos à luz artificial para a eliminação das cercárias.

Cerca de 150 cercárias foram inoculadas nos camundongos por via subcutânea e após aproximadamente 45 dias, os vermes adultos foram recuperados do sistema porta hepático por perfusão como descrito por SMITHERS & TERRY (1965).

### 3.6.2 Preparo das amostras para o ensaio

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido 100% (DMSO, *Merck*) e posteriormente, adicionou-se meio “Roswell Memorial Park Institute” (RPMI 1640), esterilizado por filtração, para obter concentração de 100  $\mu$ M, no caso de substâncias puras, e 200  $\mu$ g/mL, no caso do extrato bruto e frações orgânicas, em DMSO 0,5% (v/v). O praziquantel 10  $\mu$ M (*Merck*), preparado nas mesmas condições, foi utilizado como controle positivo.

### 3.6.3 Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Na placa de Petri, os pares de vermes obtidos dos hamsters, por perfusão, foram lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 U/mL, estreptomicina 200  $\mu$ g/mL e anfotericina B 2  $\mu$ g/mL (*Cultilab*).

Posteriormente, os parasitos acasalados foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo 1 casal de verme, por poço, em 2 mL do meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Cultilab*) e tamponado com HEPES 25 mM (*Sigma-Aldrich*) (MORAES et al., 2011a; 2011b; 2012b; 2013a; 2013b).

Diferentes concentrações das amostras foram diluídas no meio de cultura antes da adição dos parasitos, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. O praziquantel (10  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo e os poços contendo somente meio de cultura, RPMI 1640, e meio com DMSO 0,5% foram usados como controle negativo.

As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% (Thermo Scientific-Revco<sup>®</sup>) e foram monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon).

### **3.6.3.1 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* das amostras**

Para avaliar a toxicidade das amostras sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), contração muscular e alterações morfológicas no tegumento (MORAES, 2012b).

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

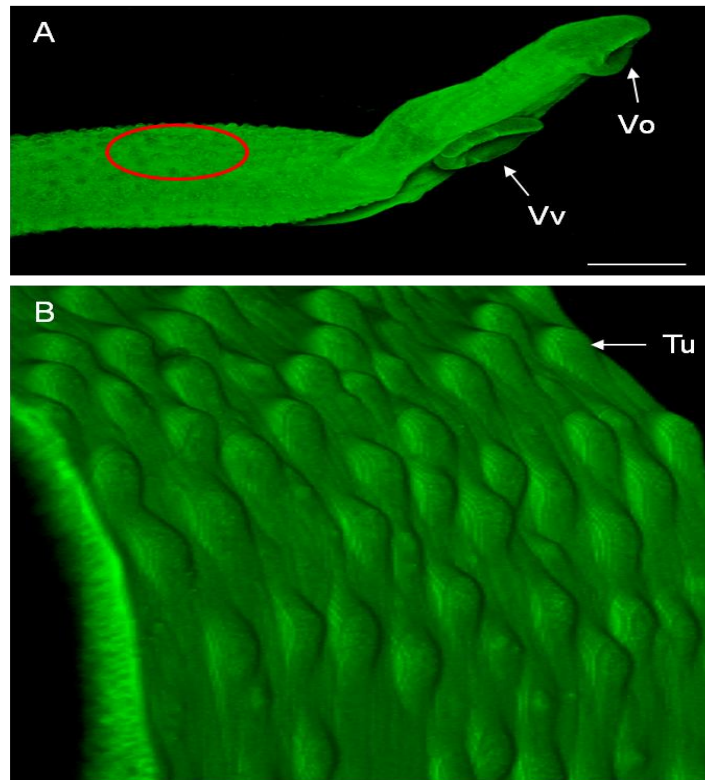
A mortalidade dos vermes foi julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos. No término do período de incubação (5 dias) ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados e analisados em microscopia confocal.

### **3.6.3.2 Análise morfológica do tegumento de vermes adultos utilizando microscopia confocal**

O efeito da substância, com maior potencial esquistossomicida, sobre o tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* foi monitorado com microscópio confocal de varredura a laser (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Carl Zeiss Inc, Standort Göttingen, Vertrieb, Deutschland).

Os parasitos foram fixados em solução AFA e monitorados, com captura de imagens, no microscópio usando os filtros de 488 nm (excitação) e 505 nm (emissão) como descrito por MORAES et al. (2009, 2011b). A solução AFA consiste em uma mistura de ácido acético glacial, formaldeído, etanol (95%) e água destilada nas proporções, respectivamente (v/v): [2: 9: 30: 59] (MORAES, 2012b).

Durante a análise microscópica foram capturadas imagens tridimensionais usando o software LSM Image Browser (Zeiss) (Figura 8).



**Figura 8.** Imagens tridimensionais da região dorsal de um macho de *Schistosoma mansoni*. Local onde é avaliado o efeito das amostras no tegumento. O parasito, mantido em meio RPMI, é fixado em solução AFA após 120 horas ou ocorrência de morte. **A:** visão geral da região anterior do helminto mostrando, em vermelho, os tubérculos. Barra = 500  $\mu\text{m}$ . **B:** imagem aumentada da região dorsal que está marcada em vermelho na imagem A. **A e B:** imagens tridimensionais, obtidas de microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510, META, Zeiss). Em **A** notar a presença das ventosas oral (Vo) e ventral (Vv). Em **B** notar os tubérculos (Tu). **Fonte:** DE MORAES (2012b).

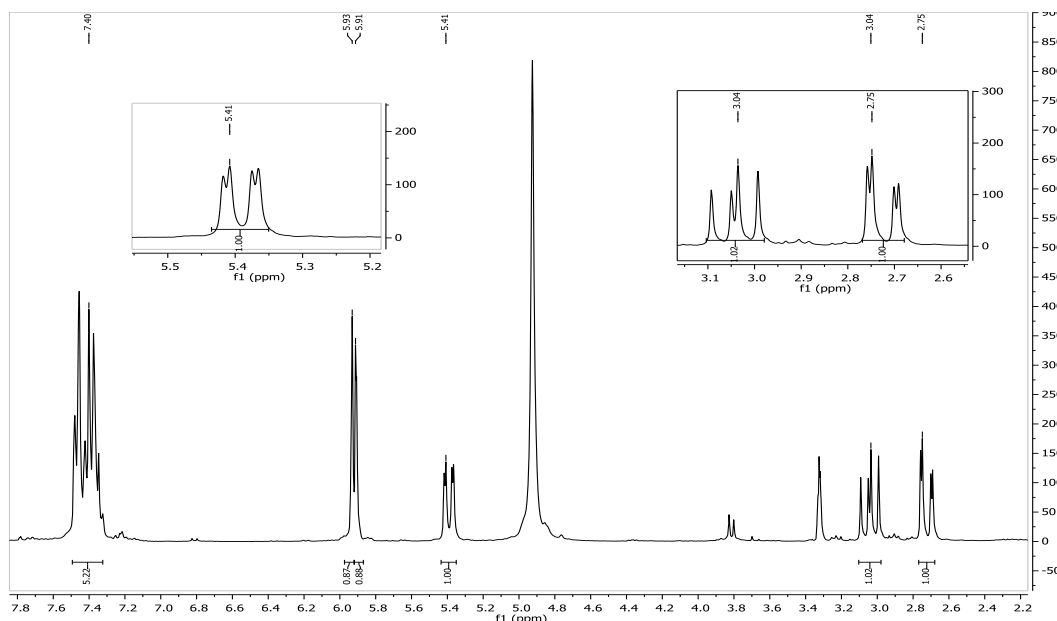
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L. resultou no isolamento de quatro substâncias, codificadas como: PaI-Fc-C5<sub>(10-14)</sub>, PaI-Fc-C6<sub>(26-29)</sub>, PaI-Fc-C6<sub>(30-35)</sub>, PaI-Fc-C7e C8<sub>(16)</sub> III.

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

#### 4.1.1 Substância PaI-Fc-C5<sub>(10-14)</sub>

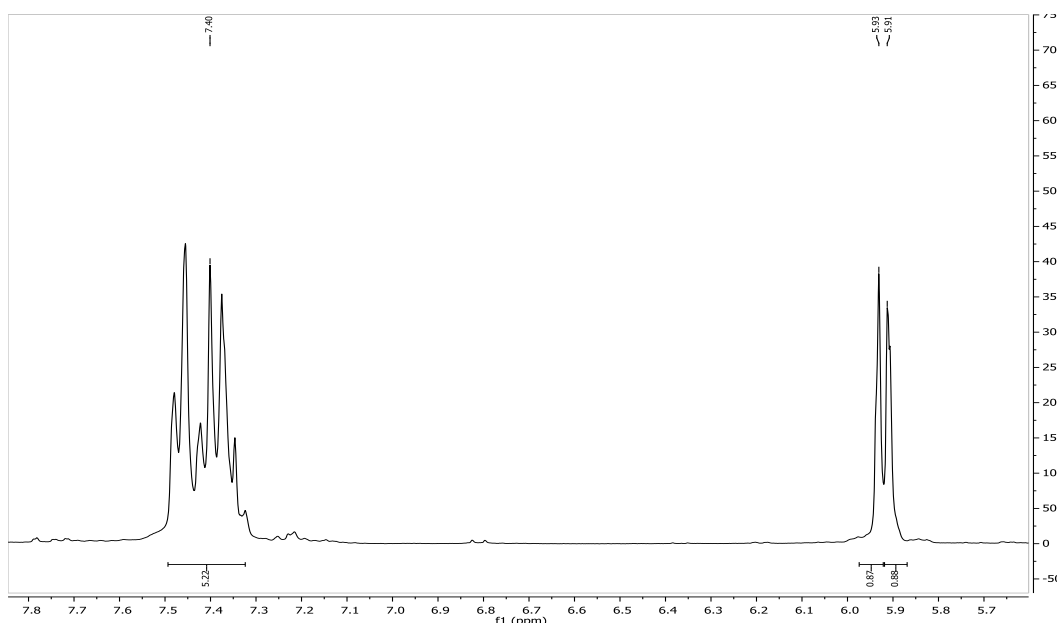
O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabela 6; Figura 12) evidencia a presença de três duplo-dupletos, integrados para 1 hidrogênio cada, nas regiões de  $\delta$  2,75, 3,04 e 5,41 ppm (Figura 9), os quais são característicos dos hidrogênios H-3eq., H-3ax. e H-2, respectivamente, do anel C de flavanonas (KRISHNA & CHAGANTY, 1972; DA SILVA FILHO, 2006).



**Figura 9.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da PaI-Fc-C5<sub>(10-14)</sub>. Expansão dos sinais dos hidrogênios H-3eq. ( $\delta$ = 2,75 ppm), H-3ax. ( $\delta$ = 3,04 ppm) e H-2 ( $\delta$ = 5,41 ppm).

Além disso, de acordo com a literatura (TEIXEIRA, 2003), os hidrogênios do anel A das flavanonas ocorrem próximos à região de 6 ppm e os hidrogênios do anel B ao redor de 7,4 ppm.

Assim, os dois simpletos largos, em  $\delta$  5,93 e  $\delta$  5,91 ppm, ambos integrados para 1 hidrogênio cada (Figura 10), foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-8 do anel A, sugerindo a presença de um anel tetrassubstituído. Já o multiplete ao redor de 7,4 ppm, integrado para 5 hidrogênios, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos do anel B, ficando este ausente de grupos substituintes oxigenados.



**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da **PaI-Fc-C5** (10-14). Expansão dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B ( $\delta= 7,40$  ppm), e dos hidrogênios aromáticos do anel A, H-6 e H-8 ( $\delta= 5,91$  e  $5,93$  ppm).

Assim, tendo em vista o padrão de substituição do anel aromático A, tetrassubstituído, e a ausência de sinais de grupos metoxílios no espectro, propõem-se como grupos substituintes deste anel duas hidroxilas, sendo uma na posição C-5 e a outra na posição C-7. Esta proposição pode ser justificada também pela biossíntese das flavanonas, uma vez que o anel A, oriundo da via do acetato-malonato, possui um padrão meta de oxidação (DEWICK, 2009; IBRAHIM, 2001).

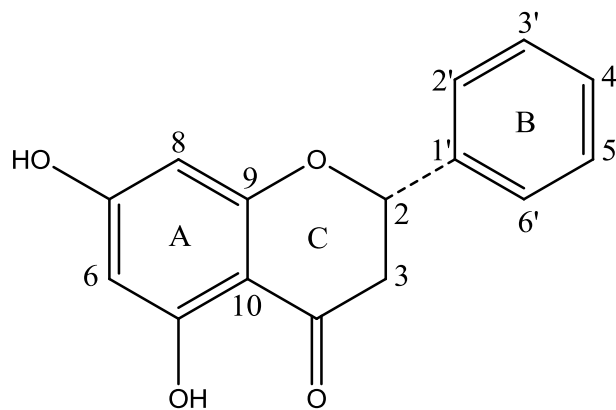
Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabelas 7; Figuras 13) observa-se um sinal em  $\delta$  42,7 ppm correspondente ao carbono metilênico C-3 e em  $\delta$  78,9 ppm, atribuído ao carbono C-2, o qual encontra-se mais desblindado devido ao efeito eletronegativo do oxigênio adjacente ao carbono C-2. Já o carbono carbonílico do anel C pode ser observado em  $\delta$  195,8 ppm.

Em continuação a análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  observa-se a presença de três sinais entre 126,2 a 138,9 ppm, os quais ao serem comparados com os dados da literatura (TEIXEIRA, 2003), mostram-se compatíveis com os carbonos C-1', C-2', C-6' e C-3', C-4', C-5'.

Já com relação aos carbonos do anel A, há a presença de três sinais entre 163,2 a 166,9 ppm, típicos de carbonos oxigenados, os quais foram atribuídos aos carbonos C-5, C-7 e C-9.

Ainda, observam-se dois sinais em  $\delta$  94,9 e 95,8 que, quando comparados com dados espectroscópicos da literatura (TEIXEIRA, 2003), mostram-se compatíveis aos carbonos C-6 e C-8.

Assim, a comparação dos dados espectroscópicos obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância **PaI-Fc-C5** (10-14) com os dados oriundos da literatura (POSSO et al., 1994; TEIXEIRA, 2003; MAGALHÃES, 2012), permite concluir que a **PaI-Fc-C5** (10-14) seja a flavanona 5,7-dihidroxi-flavanona, conhecida como pinocembrina, representada a seguir (Figura 11).



**Figura 11.** Estrutura química da (*S*)-5,7-dihidroxi-flavanona.

Nesta molécula, há um centro de quiralidade em C-2 e, portanto, são possíveis duas formas enantioméricas, (*R*)-5,7-dihidroxi-flavanona e (*S*)-5,7-dihidroxi-flavanona (SOLOMONS & FRYHLE, 2012).

No entanto, de acordo com a literatura a rota biossintética para as flavanonas, já estabelecida, preconiza que as flavanonas são obtidas a partir das chalconas por meio de uma reação de Michael estereoespecífica, catalizada pela chalcona isomerase. Esta enzima



converte as chalconas em suas respectivas flavanonas com configuração (*S*) (DEWICK, 2009; IBRAHIM, 2001). Assim, considerando a rota biossintética estereoespecífica descrita, sugere-se uma configuração (*S*) para a 5,7-dihidroxi-flavanona identificada nas inflorescências de *P. aduncum*.

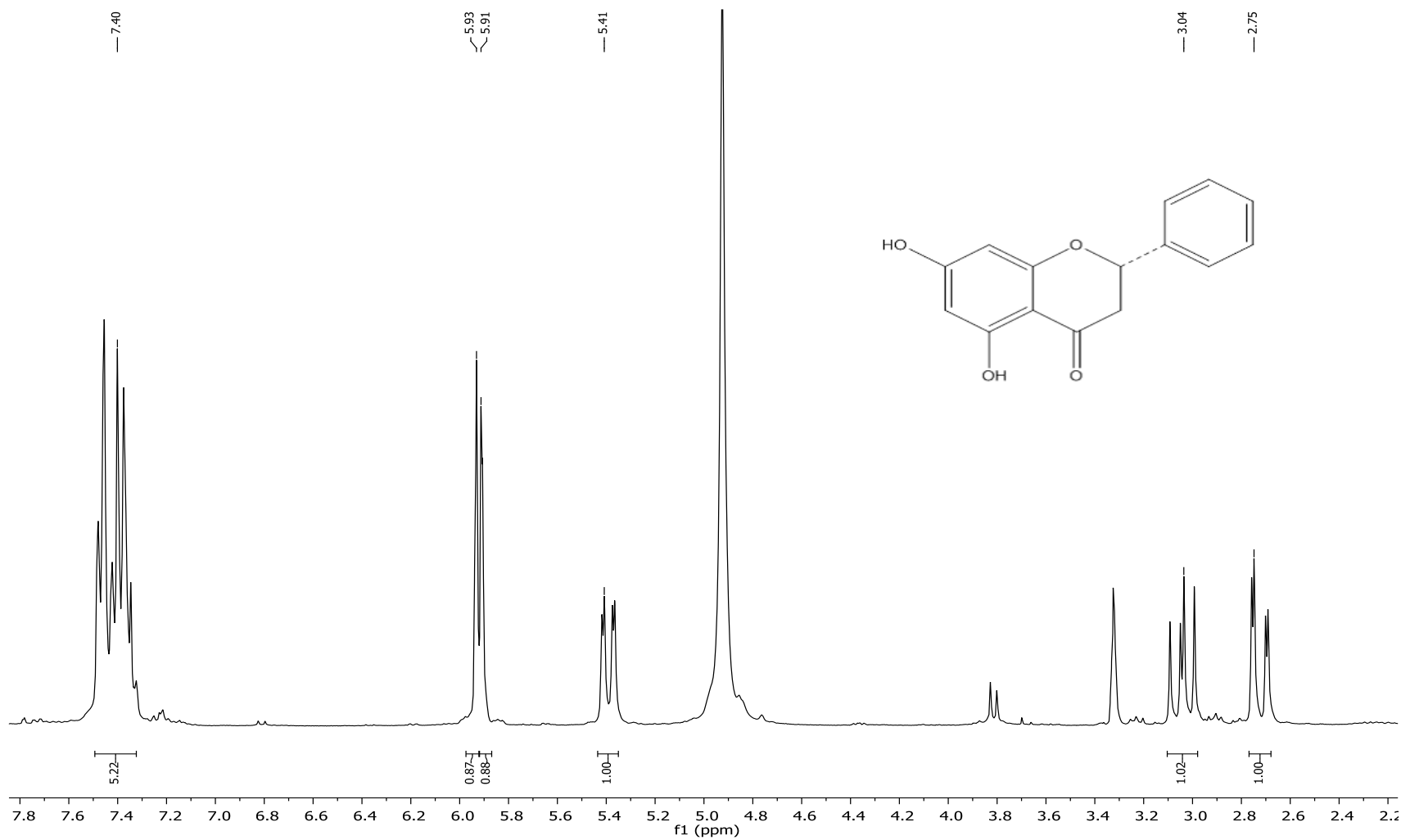
**Tabela 6.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C5** (10-14) e dados da 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina) descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Obtidos		Literatura* ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)
	Deslocamento químico ( $\delta$ =ppm)	Constante de acoplamento ( $J$ =Hz)	
<b>3 eq</b>	2,75 (1H, dd)	2,5 e 14,2	2,8 (1H; dd; $J$ =3,0 e 17,3)
<b>3 ax</b>	3,04 (1H; dd)	10,7 e 14,2	3,0 (1H; dd; $J$ = 12,8 e 17,3)
<b>2</b>	5,41 (1H; dd)	2,5 e 10,7	5,4 (1H; dd; $J$ = 3,0 e 12,8)
<b>6</b>	5,91 <sup>a</sup> (1H; s)	---	6,0 <sup>#</sup> (2H; d; $J$ =3,0)
<b>8</b>	5,93 <sup>a</sup> (1H; s)	---	
<b>Anel B</b>	7,40 (5H; m)	---	7,40 (5H; m)

\*Teixeira, 2003; RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz);  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>a</sup> Os valores podem estar trocados;

<sup>#</sup> Sinais sobrepostos, de acordo com a literatura (TEIXEIRA, 2003)

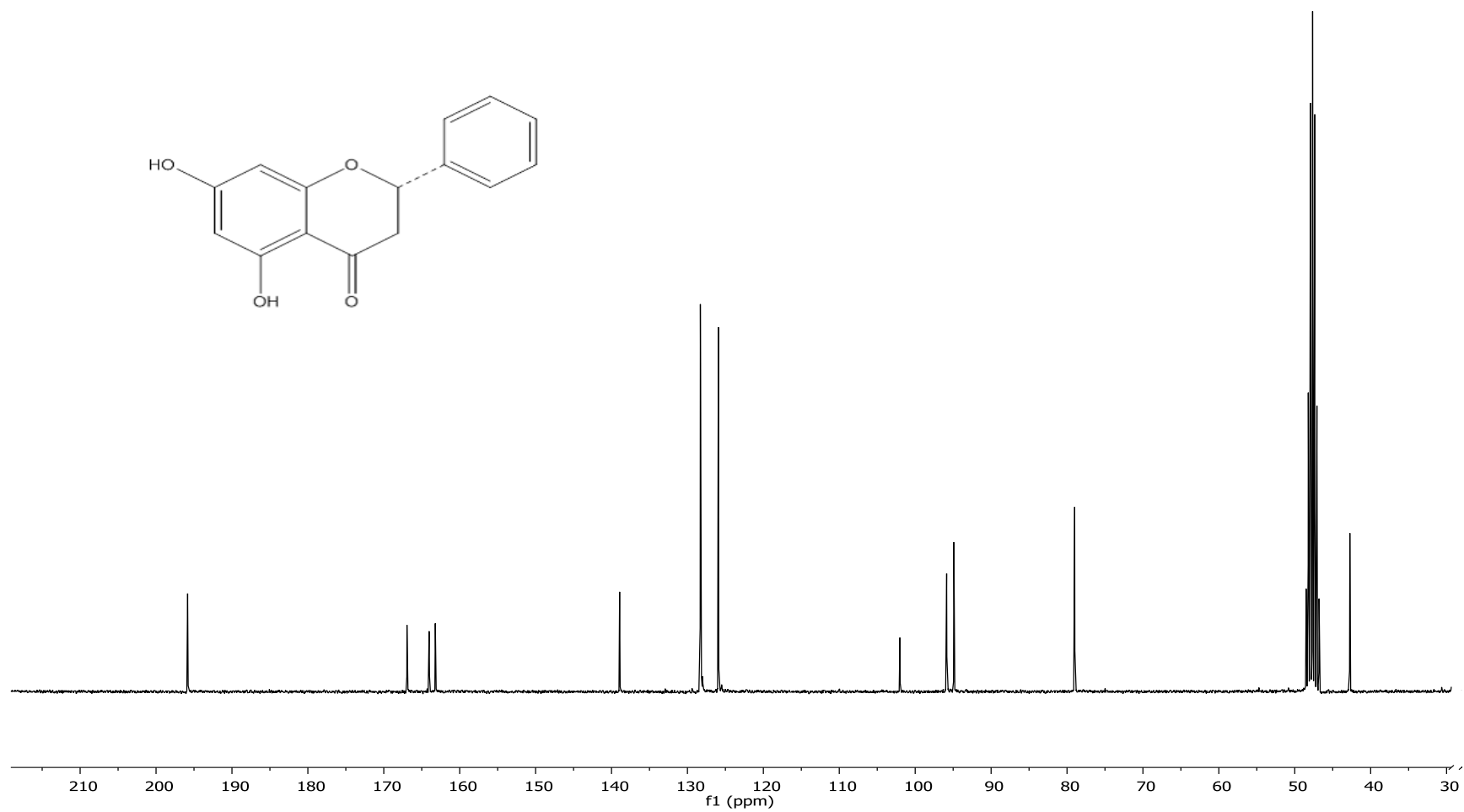


**Figura 12.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da (S)-5,7-dihidroxi-flavanona (300 MHz, MeOD).

**Tabela 7.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C5**<sub>(10-14)</sub> e dados da 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina) descritos na literatura.

<b>Carbonos</b>	<b>Dados Obtidos (ppm)</b>	<b>Literatura* (ppm)</b>
<b>2</b>	78,9	78,4
<b>3</b>	42,7	42,2
<b>4</b>	195,8	195,8
<b>5</b>	164,0	163,6
<b>6</b>	95,8	96,4
<b>7</b>	166,9	166,6
<b>8</b>	94,9	95,2
<b>9</b>	163,2	162,8
<b>10</b>	102,1	102,1
<b>1'</b>	138,9	138,2
<b>2' 6'</b>	126,2	126,8
<b>3'4' 5'</b>	128,3	128,5

\*Teixeira, 2003; RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz);  $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ .



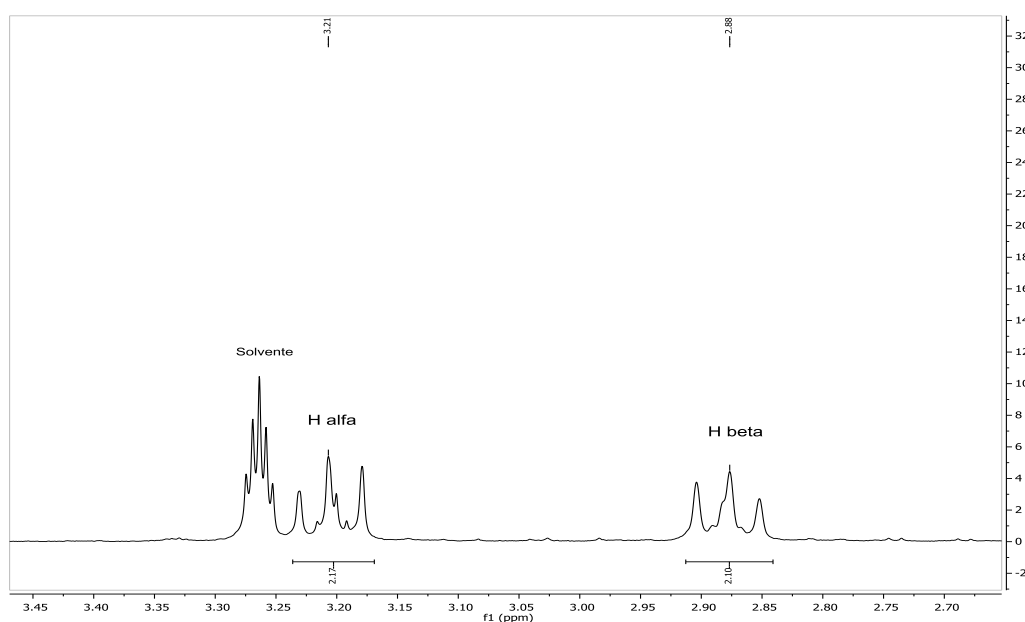
**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da (S)-5,7-dihidroxi-flavanona (75 MHz, MeOD).

A 5,7-dihidroxi-flavanona, conhecida como Pinocebrina, está presente em diferentes espécies do gênero *Piper*, a saber: *Piper sarmentosum* (LI PAN et al., 2011), *P. hispidum* (RUIZ et al., 2011), *P. hostmannianum* (DIAZ et al., 1987; LAGO et al., 2004), *P. lanceaefolium* (LÓPEZ et al., 2001; RUDDOCK et al., 2011), *P. chimonantifolium* (LAGO et al., 2012), *P. gaudichaudianum* (TEIXEIRA, 2003; LAGO et al., 2004), *P. porphyrophyllum* (RAJUDIN et al., 2010), *P. steerni* (POSSO et al., 1994) e *P. aduncum* (LAGO et al., 2004).

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que demonstra a presença da 5,7-dihidroxi-flavanona nas inflorescências de *P. aduncum*, uma vez que, LAGO e colaboradores (2009) isolaram-na a partir das folhas desta espécie.

#### 4.1.2 Substância PaI-Fc-C6 (26-29)

Na análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 8 e Figura 17) observa-se a presença de dois tripletos em  $\delta$  3,21 ppm ( $J= 8,1$  Hz, 2H) e 2,88 ( $J= 8,1$  Hz, 2H) (Figura 14), compatíveis aos hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  carbonílicos respectivamente, característicos do núcleo de uma diidrochalcona (HUFFORD & OGUNTMEIN, 1980; ORJALA et al., 1994; REIGADA, 2009).

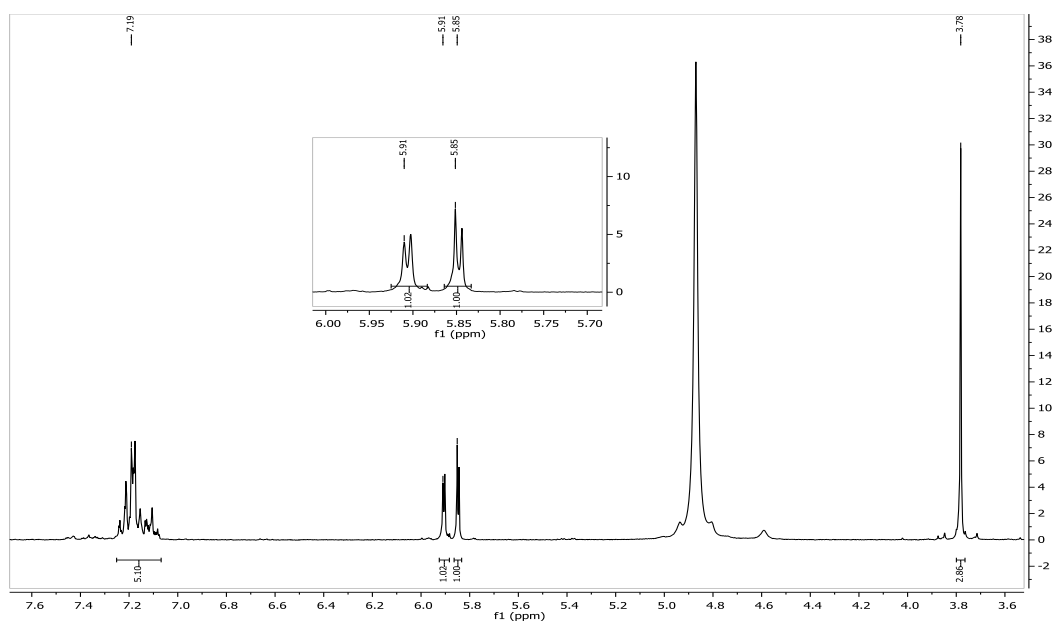


**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da PaI-Fc-C6 (26-29). Expansão dos sinais dos hidrogênios  $\alpha$  ( $\delta= 3,21$  ppm) e  $\beta$  ( $\delta= 2,88$  ppm) carbonílicos.

Em continuidade, observa-se um multipletto em  $\delta$  7,19 ppm, integrado para 5 hidrogênios, referentes aos hidrogênios do anel B da diidrochalcona (Figura 15).

No anel aromático A, observa-se a presença dois dupletos, visualizados em  $\delta$  5,85 (1H;  $J= 2,1$  Hz) e em 5,91 ppm (1H;  $J=2,1$  Hz) (Figura 15), que, devido à magnitude da constante de acoplamento ( $J_{3',5'}= 2,1$  Hz) observada, sugere acoplamento meta entre eles. Podemos inferir ainda que este anel aromático é tetrassubstituído já que, além destes hidrogênios, não se observam outros sinais referentes a hidrogênios aromáticos deste anel.

Além disso, a presença de um simpleto em  $\delta$  3,78 ppm, integrado para 3 hidrogênios, indica a presença de uma metoxila na molécula (Figura 15).



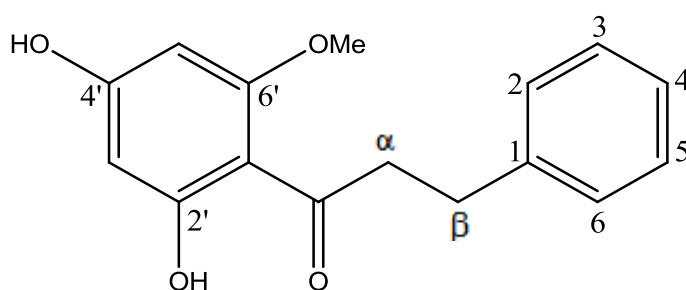
**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da PaI-Fc-C6 (26-29). Expansão dos sinais dos hidrogênios: H-3' e H-5' ( $\delta= 5,85$  e  $5,91$  ppm) do anel A; H-aromáticos do anel B ( $\delta= 7,19$  ppm) e H-metílicos ( $\delta= 3,78$  ppm).

Tendo em vista o padrão de substituição do anel aromático A, tetrassubstituído, e a presença de apenas um grupo substituinte metoxílico sugere-se, portanto, a presença de duas hidroxilas como adicionais deste anel.

Em relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 9, Figura 18), pode-se observar os sinais em  $\delta$  45,5 e em  $\delta$  30,6, os quais foram atribuídos aos carbonos metilênicos  $\text{C}_\alpha$  e  $\text{C}_\beta$  carbonílicos, respectivamente. Já o sinal em  $\delta$  204,2 foi atribuído ao carbono carbonílico desta diidrochalcona.

Observa-se ainda a presença dos sinais em  $\delta$  95,5 e  $\delta$  90,7 ppm compatíveis com os carbonos C-3' e C-5', pertencentes ao anel A. Já os sinais entre  $\delta$  125 a 145 ppm foram atribuídos aos carbonos do anel B, estando de acordo com a literatura (ÁVILA, et al., 2011).

Assim, a análise dos dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância **PaI-Fc-C6** (26-29) e comparação com os dados oriundos da literatura (HUFFORD & OGUNTMEIN, 1980; ÁVILA et al., 2011), permitem concluir que esta substância seja a 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona, representada a seguir (Figura 16).



**Figura 16.** Estrutura química da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona.

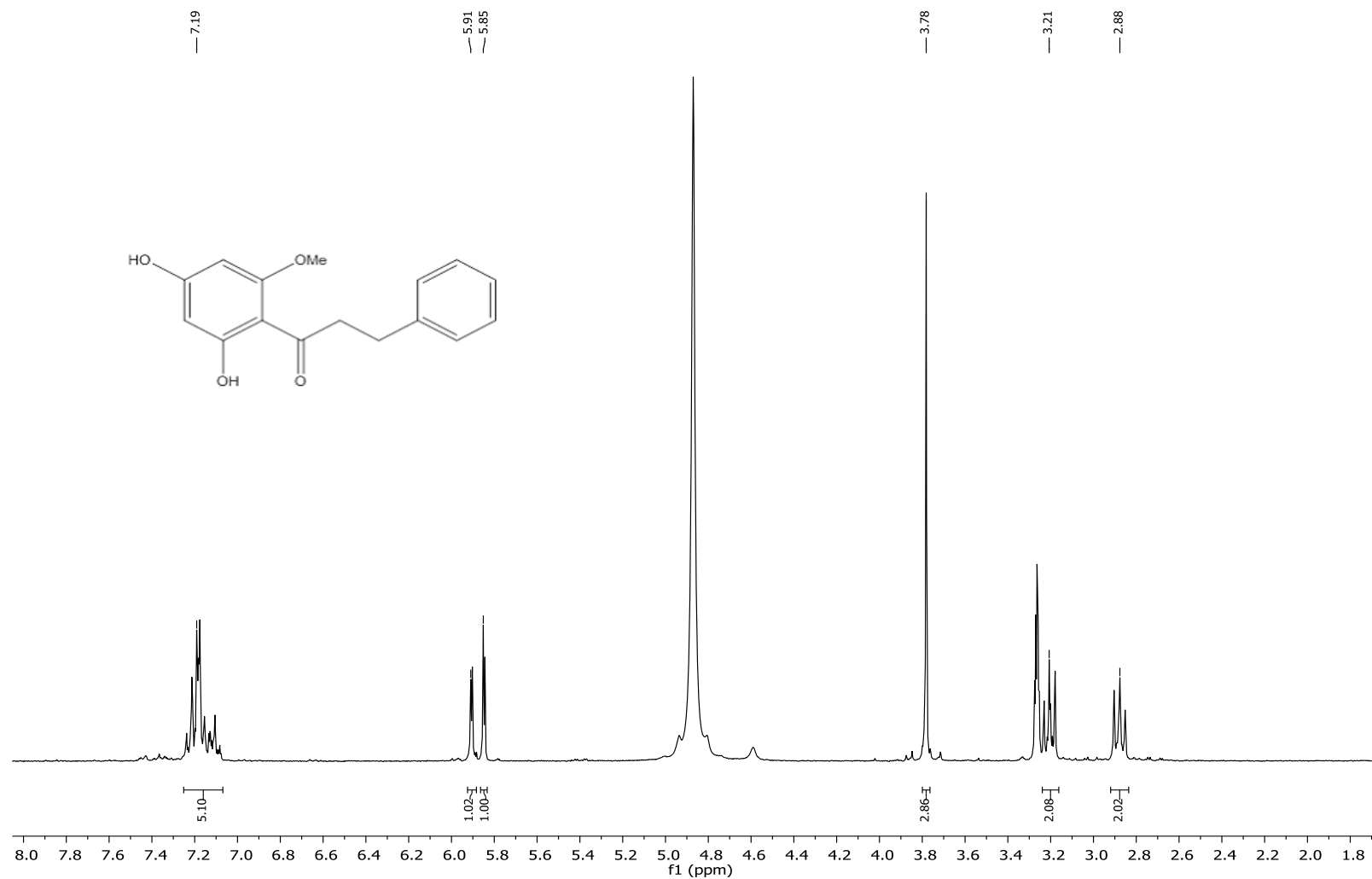
**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C6** (26-29) e dados da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina) descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Obtidos		Literatura* ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)
	Deslocamento químico ( $\delta$ =ppm)	Constante de acoplamento ( $J$ =Hz)	
$\alpha$	3,21 (2H; t)	8,1	3,47- 2,77 (4H; m)
$\beta$	2,88 (2H; t)	8,1	
-MeO	3, 78 (3H; s)	----	3,87 (3H; s)
3'	5, 91 <sup>a</sup> (1H; d)	2,1	5,97 <sup>a</sup> (1H; d; $J=2$ )
5'	5, 85 <sup>a</sup> (1H; d)	2,1	5,91 <sup>a</sup> (1H; d; $J=2$ )
2, 3, 4, 5, 6	7,19 (5H; m)	---	7,20 (5H; m)

\* HUFFORD & OGUNTMEIN, 1980; RMN de  $^1\text{H}$  (60 MHz);  $\text{CDCl}_3$ ;

<sup>a</sup> Os valores podem estar trocados





**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-dihidrochalcona (300 MHz, MeOD)

**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C6** (26-29) e dados da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina) descritos na literatura.

<b>Carbonos</b>	<b>Dados Obtidos (<math>\delta = \text{ppm}</math>)</b>	<b>Literatura* (<math>\delta = \text{ppm}</math>)</b>
<b><math>\alpha</math></b>	45,5	46,2
<b><math>\beta</math></b>	30,7	31,4
<b>C=O</b>	204,2	205,0
<b>-MeO</b>	54,7	56,1
<b>1'</b>	104,6	105,7
<b>2'</b>	163,5 <sup>a</sup>	164,5 <sup>a</sup>
<b>4'</b>	164,9 <sup>a</sup>	165,4 <sup>a</sup>
<b>6'</b>	166,9	168,3
<b>3'</b>	95,6	96,9
<b>5'</b>	90,7	91,9
<b>1</b>	141,6	142,7
<b>2, 6</b>	128,0	129,1 <sup>b</sup>
<b>4</b>	125,8	126,5
<b>3, 5</b>	128,0	129,2 <sup>b</sup>

\* HUFFORD & OGUNTIMEIN, 1980; RMN de  $^{13}\text{C}$  (15 MHz);  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>a,b</sup> Os valores podem estar trocados



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-dihidrochalcona (75 MHz, MeOD).

A 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona, conhecida como uvangoletina, apesar de ser uma substância já isolada e identificada de diferentes espécies vegetais, como *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae) (KOORBANALLY et al., 2003), *Uvaria acuminata* (Annonaceae) (ICHIMARU et al., 2004), *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae) (CHEENPRACHA et al., 2006), *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) (ISOBE et al., 2002) e *Piper septuplinervium* (Piperaceae) (ÁVILA et al., 2011), este é primeiro relato do isolamento e identificação desta substância na espécie *P. aduncum*.

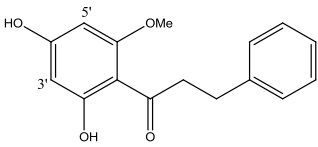
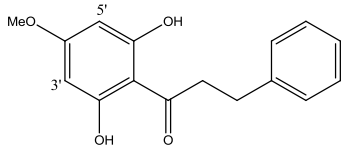
Entretanto, a substância 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona (Tabela 10, B), isômero constitucional da uvangoletina, já foi isolada de diferentes espécies de *Piper* como exemplo, *P. mollicomum* (LAGO et al., 2007; REIGADA, 2009), *P. longicaudatum* (JOSHI et al., 2001), *P. carpunya* (QUÍLEZ et al., 2010), *P. hostmannianum* (PORTET et al., 2008), *P. elongatum* (HERMOSO et al., 2003) e inclusive *P. aduncum* (BURKE & NAIR, 1986; ORJALA et al., 1994; MOREIRA et al., 1998; BALDOQUI et al., 1999; MORANDI et al., 2009; TOMIO, 2011).

A uvangoletina (2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona) (Tabela 10, A) foi diferenciada da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona, substância já isolada de *P. aduncum*, por meio dos sinais dos hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5' (Tabela 10) em seus respectivos espectros.

Os hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5' pertencentes à 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona são quimicamente e magneticamente equivalentes, por haver um plano de simetria no anel A, o que faz com que os sinais de hidrogênios e carbonos sejam equivalentes (ORJALA et al., 1994; HERMOSO et al., 2003; LAGO et al., 2007; REIGADA et al., 2009).

Já os hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5', pertencentes à 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina), por não serem química e magneticamente equivalentes, apresentam-se em deslocamentos químicos distintos, como observado na tabela 10 (HUFFORD & OGUNTMEIN, 1980; ÁVILA et al., 2011).

**Tabela 10.** Comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5' de ambas as diidrochalconas.

Posições	* 		** 	
	A: 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi diidrochalcona		B: 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-diidrochalcona	
	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
3'	5, 91 <sup>a</sup> (d; 1H)	96,9	5,91 (s; 2H)	93,7
5'	5, 97 <sup>a</sup> (d; 1H)	91,9		

<sup>a</sup> Os valores podem estar trocados ;  $\delta = \text{ppm}$

\* HUFFORD & OGUNTMEIN, 1979

\*\* HERMOSO, 2003

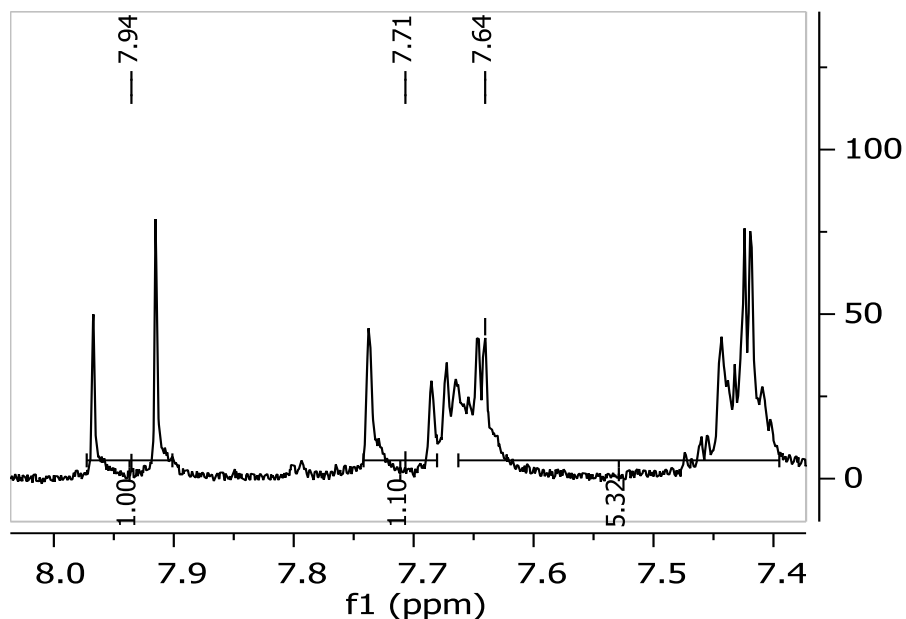
#### 4.1.3 Substância PaI-Fc-C6 (30-35)

Na análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H desta substância, observou-se que a mesma estava contaminada com a 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona (uvangoletina; item 4.1.2). Tal fato pode ser justificado devido à semelhança estrutural e à proximidade dos valores dos Rf's (fator de retenção) de ambas as substâncias, não sendo possível separá-las com as técnicas cromatográficas disponíveis.

Apesar disso, ao se conhecer a estrutura química do contaminante, uvangoletina, e seus respectivos sinais no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, foi possível propor a estrutura da **PaI-Fc-C6** (30-35), como descrito a seguir.

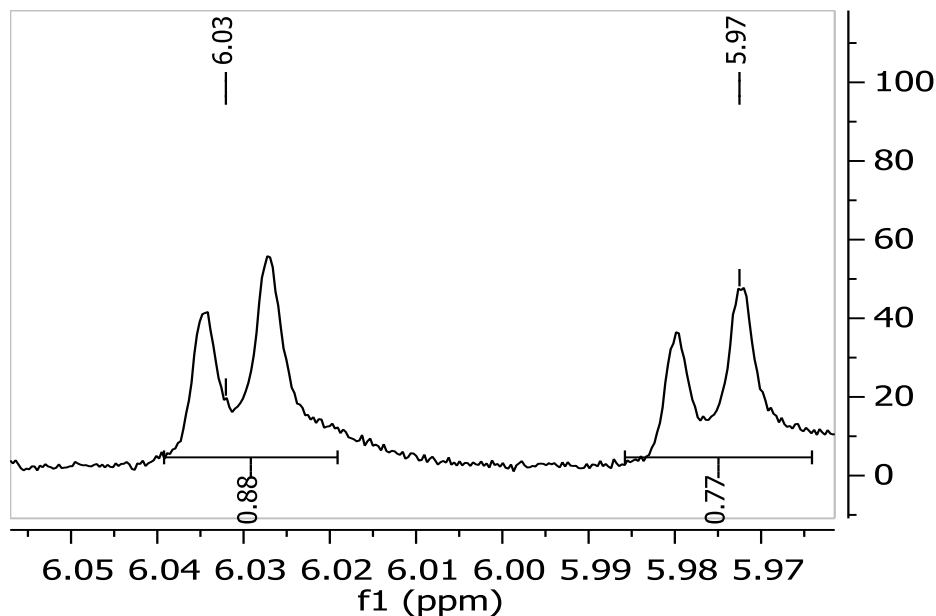
Na análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Tabela 11), observa-se a presença de dois dupletos em  $\delta$  7,71 e 7,94, integrados para 1 hidrogênio cada (Figura 19). Os sinais são compatíveis com os hidrogênios olefínicos H <sub>$\alpha$</sub>  e H <sub>$\beta$</sub>  carbonílicos, característicos da estrutura das chalconas (KRISHNA & CHAGANTY, 1972; SHIMOMURA et al., 1988; XIAO et al., 2011). Além disso, por meio do valor da constante de acoplamento,  $J_{\alpha, \beta} = 15,6$  Hz, entre estes hidrogênios, pode-se inferir que esta chalcona possui configuração *trans* (PAVIA et al., 2010).

Em continuidade, foram observados dois multipletos em  $\delta$  7,64 e em  $\delta$  7,45 ppm, integrados para 2 e 3 hidrogênios, respectivamente (Figura 19), os quais são pertencentes ao anel aromático B, sugerindo ainda que este seja monossustituído.



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da **PaI-Fc-C6** (30-35). Expansão dos hidrogênios  $\alpha$ ,  $\beta$  carbonílicos ( $\delta = 7,94$  e  $7,71$  ppm) e dos hidrogênios do anel aromático B ( $\delta = 7,64$  e  $7,45$  ppm).

Além disso, pode-se observar a presença de dois dupletos em  $\delta$  5,97 e em  $\delta$  6,03 ppm, integrados para 1 hidrogênio cada (Figura 20), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-5' e H-3'. Considerando que estes hidrogênios, H-5' e H-3', apresentam constante de acoplamento de  $J_{3',5'} = 2,1$  Hz, sugere-se que os mesmos estão em posição meta. Ainda pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , podemos inferir que o anel aromático A é tetrassubstituído, devido a presença de apenas 2 hidrogênios (KRISHNA & CHAGANTY, 1972; PAVIA et al., 2010).

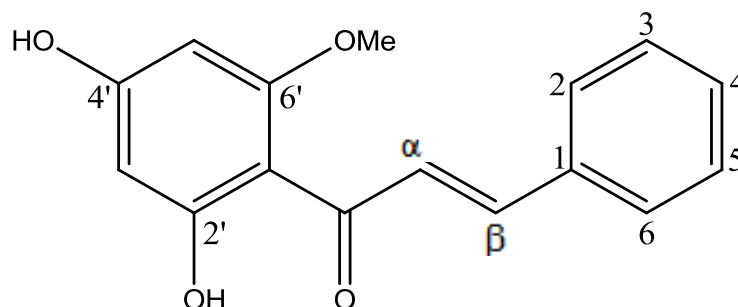


**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da **PaI-Fc-C6** (30-35). Expansão da região dos hidrogênios aromáticos H-3' e H-5' do anel aromático A.

Finalmente, a presença de um simpleto em  $\delta$  3,95 ppm, integrado para 3 hidrogênios, evidencia a presença de uma metoxila na molécula.

Tendo em vista o padrão de substituição do anel aromático A, tetrassubstituído, e a presença de apenas um grupo metoxílico nesta molécula, sugere-se, portanto, a presença de duas hidroxilas como os demais grupos substituintes.

Assim, a comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos com aqueles previamente publicados na literatura (KRISHNA & CHAGANTY, 1972), sugere que esta substância seja a 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona, representada a seguir (Figura 21).



**Figura 21.** Estrutura química da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona.

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C6** (30-35) e dados da 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona (cardamonina) descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Obtidos		Literatura* ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)
	Deslocamento químico ( $\delta$ =ppm)	Constante de acoplamento ( $J$ =Hz)	
$\alpha$	7,71 (d; 1H)	15,6	7,72 (d, 1H, $J$ =15,5)
$\beta$	7,94 (d; 1H)	15,6	7,87 (d, 1H, $J$ =15,5)
-MeO	3,95 (s; 3H)	----	3,87 (s, 3H)
3'	5,97 (d; 1H)	2,1	5,94 (d, 1H, $J$ =2)
5'	6,03 (d; 1H)	2,1	6,02 (d, 1H, $J$ =2)
Anel B	7,64 e 7,45 (m; 5H)	---	7,37 e 7,32 (m; 5H)

\* KRISHNA & CHAGANTY, 1972; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz);  $\text{CDCl}_3$ .

A 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-chalcona, conhecida como cardamonina, apesar de já ter sido isolada de espécies de *Piper*, como *P. dilatatum* (TERREAUX et al., 1998) e *P. hispidum* (RUIZ et al., 2011), este é primeiro relato do isolamento e identificação desta substância na espécie *P. aduncum*.

Entretanto, já há relatos na literatura que evidenciam a presença de um isômero da cardamonina nas inflorescências de *P. aduncum*, a substância 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona, conhecida como pinostrobina chalcona (TORRES-SANTOS et al., 1999). Estas chalconas se diferenciam nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  por meio dos deslocamentos químicos gerados pelos hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5'.



Na cardamonina, os hidrogênios e os carbonos das posições 3' e 5' são evidenciados em deslocamentos químicos distintos e, quando há o acoplamento entre os hidrogênios, estes apresentam-se como dois dupletos (KRISHNA & CHAGANTY, 1972).

Já na pinostrobrina chalcona, os respectivos hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5', são observados um mesmo deslocamento químico (KRISHNA & CHAGANTY, 1972; SHIMOMURA et al., 1988; XIAO, et al., 2011).

#### 4.1.4 Substância **PaI-Fc-C7 e C8** <sub>(16)</sub> **III**

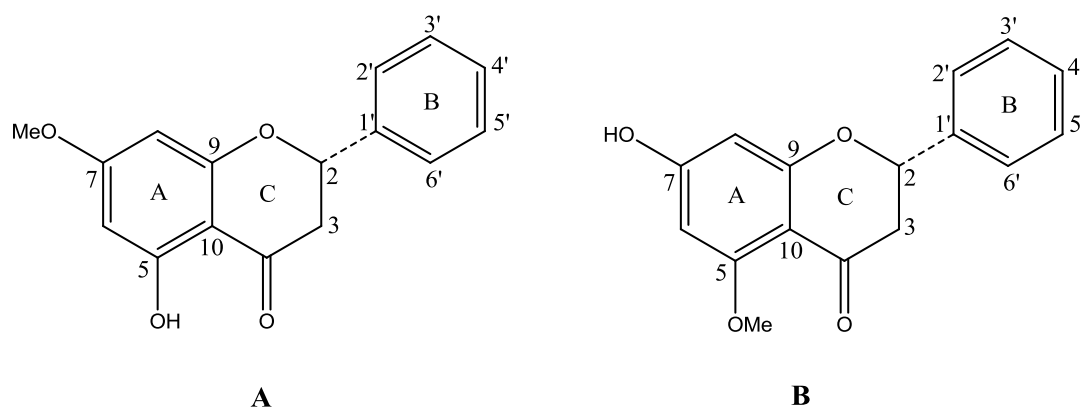
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta substância (Tabela 12; Figura 23) apresenta em  $\delta$  2,75 ( $J= 2,7$  Hz e  $J= 14,2$  Hz; 1H), 3,0 ( $J=10,7$  Hz e  $J=14,2$  Hz; 1H) e 5,41 ppm ( $J=2,7$  Hz e  $J=10,7$  Hz; 1H) três duplo-dupletos, integrados para 1 hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios H-3eq., H-3ax. e H-2, respectivamente, os quais são típicos dos hidrogênios do anel C das flavanonas, conforme descrito anteriormente.

Além disso, a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , evidencia a presença de um multiplete na região de 7,40 ppm, integrado para 5 hidrogênios, compatível com os sinais de hidrogênios aromáticos do anel B. Já os hidrogênios do anel A ocorrem como simpletos largos em  $\delta$  6,04 e  $\delta$  6,09 ppm, sinais atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-6 e H-8.

Nota-se ainda que estes sinais são semelhantes àqueles discutidos anteriormente para a flavanona pinocembrina (item 4.1.1). Entretanto, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **PaI-Fc-C7 e C8** <sub>(16)</sub> **III** mostra ainda a presença de um simpleto, integrado para 3 hidrogênios, em  $\delta$  3,84 ppm, evidenciando a ocorrência de uma metoxila nesta molécula..

Tendo em vista o padrão de substituição do anel aromático A, tetrassubstituído, e a presença de apenas uma metoxila, sugere-se, portanto, a ocorrência de uma hidroxila como outro grupo substituinte adicional no anel A.

Assim, a comparação dos dados obtidos com os da literatura (POSSO et al., 1994; XIAO et al., 2011; MAGALHÃES, 2012), sugere duas possíveis estruturas: a 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (A), conhecida como pinostrobrina ou 5-metoxi-7-hidroxi-flavanona, conhecida como alpinetina (B) (Figura 22).



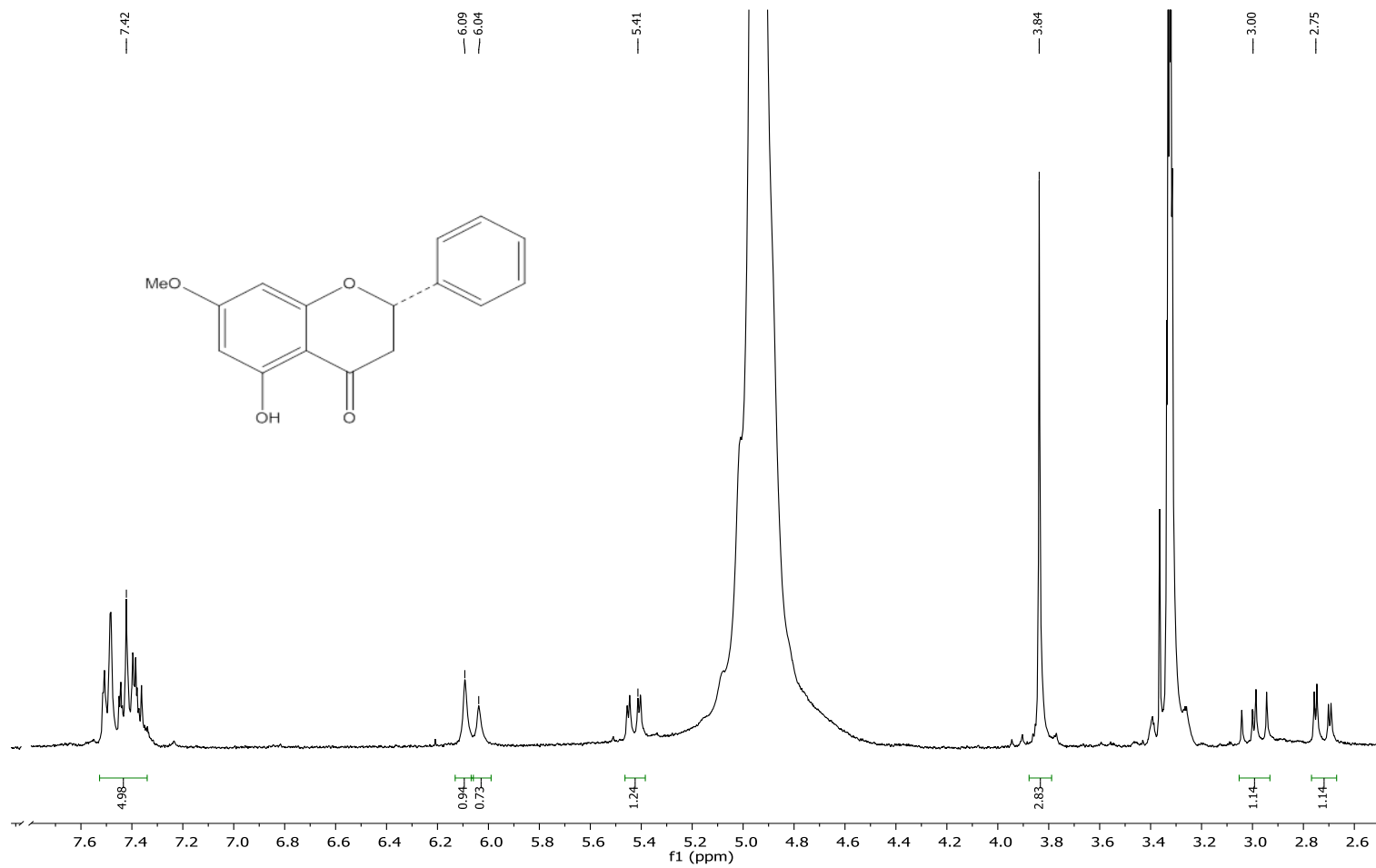
**Figura 22.** Estrutura química das possíveis flavanonas. **A:** 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (pinostrobin); **B:** 5-metoxi-7-hidroxi-flavanona (alpinetina).

**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) da **PaI-Fc-C7e C8** (16) III e dados da 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (pinostrobin) e da 5-metoxi-7-hidroxi-flavanona (alpinetina) descritos na literatura.

Hidrogênios	Dados Obtidos ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)	Pinostrobin* ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)	Alpinetina** ( $\delta$ =ppm; $J$ =Hz)
<b>2</b>	5,41 (dd; 1H; $J$ = 2,7 e 10,7)	5,42 (dd; 1H; $J$ =2,8 e 12,8)	5,51 (dd; 1H; $J$ =3,2 e 12,6)
<b>3 eq</b>	2,75 (dd; 1H; $J$ = 2,7 e 14,2)	2,82 (dd; 1H; $J$ =2,8 e 16,9)	2,72 (dd; 1H; $J$ =3,2 e 16,6)
<b>3 ax</b>	3,00 (dd; 1H; $J$ = 10,7 e 14,2)	3,07 (dd; 1H; $J$ =13,2 e 16,9)	2,98 (dd; 1H; $J$ =12,6 e 16,6)
<b>-OMe</b>	3,84 (s; 3H)	3,81 (s; 3H)	3,81 (s; 3H)
<b>6</b>	6,04 (s; 1H)	6,07 (d; 1H; $J$ =2,4)	6,03 (m; 1H)
<b>8</b>	6,09 (s; 1H)	6,08 (d; 1H; $J$ =2,4)	6,08 (m; 1H)
<b>Anel B</b>	7,42 (m; 5H)	7,42 (m; 5H)	7,3 (m; 5H)

\*MAGALHÃES, 2012; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz);  $\text{CDCl}_3$

\*\*XIAO et al., 2011; RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz); MeOD



**Figura 23.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da pinostrobin ou alpinetina (300 MHz, MeOD).

A pinostrobinina (5-hidroxi-7-metoxi-flavanona) está presente em diferentes espécies de *Piper*, como *P. methysticum* (DI WU et al., 2002), *P. guanacastensis* (PEREDA-MIRANDA, 1997), *P. aduncum* (BURKE e NAIR, 1986), *P. fadyenni*, *P. hispidum* e *P. steerni* (ALVES, 2008). Igualmente à pinostrobinina, a alpinetina (5-metoxi-7-hidroxi-flavanona) também já foi isolada de *P. methysticum* (SANTOS et al., 2009) e inclusive de *P. aduncum* (MOREIRA et al., 1998).

Considerando os dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos e que ambas as substâncias já foram isoladas de *P. aduncum*, dados espectroscópicos adicionais serão obtidos no intuito de se confirmar qual das duas estruturas propostas é a correta para esta substância.

## **4.2 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS INFLORESCÊNCIAS DE *P. aduncum* FRENTE A VERMES ADULTOS DE *S. mansoni***

### **4.2.1 Atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* (PaI) e suas frações orgânicas obtidas (PaI-Fc, PaI-Fh, PaI-Fa)**

Apesar de vários estudos apresentarem os potenciais efeitos de extratos e partições de preparações vegetais frente aos parasitos da espécie *S. mansoni* (BRAGUINE et al., 2010; CAIXETA et al., 2011; KONÉ et al., 2011; YOUSIF et al., 2007), até o presente momento não há relatos na literatura quanto à atividade esquistossomicida de extratos das inflorescências de *P. aduncum*.

Além disso, estudos têm demonstrado potencial atividade esquistossomicida *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Piper*, como por exemplo, *P. tuberculatum* e *P. amalago* (CARRARA et al., 2013; MORAES et al., 2011a).

Assim, considerando seu potencial, o extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI**) foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, sendo os resultados apresentados na tabela 13.

**Tabela 13.** Efeito do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>Controle</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
<b>Praziquantel 10 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>PaI 200 µg/mL</b>	24	100	0	100	0	0
	48	100	0	100	0	0
	72	100	0	100	0	0
	96	100	0	100	0	0
	120	100	0	100	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes; <sup>b</sup> Meio RPMI; <sup>c</sup> DMSO em meio RPMI.

Ressalta-se que em todos os ensaios, o grupo controle, meio RPMI e DMSO 0,5% não apresentaram qualquer alteração na mortalidade, atividade motora e tegumento dos vermes adultos, comprovando que o meio e o veículo não exerceram efeitos sobre os parasitos avaliados, conforme preconiza a literatura (DE MELO et al., 2011).

Avaliado na concentração de 200 µg/mL, o extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L. (PaI) causou morte e redução da atividade motora em 100% dos vermes adultos após 24 h de incubação, semelhante ao observado pelo PZQ (10 µM), entretanto, o extrato não foi capaz de causar alterações tegumentares nos parasitos.

Segundo FLORES e colaboradores (2009), o extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L. também possui atividade leishmanicida e tripanocida, frente à *Leishmania brasiliensis* e ao *Trypanosoma cruzi*, respectivamente.

Já com relação ao extrato diclorometânico das folhas *P. aduncum* L, CARRARA e colaboradores (2013) demonstraram este extrato, na concentração de 100 µg/mL, também possui atividade esquistossomicida moderada, já que foi capaz de provocar a morte de 75% dos parasitos e redução de 50% da atividade motora em 24 horas de incubação. Ainda, TOMIO (2011), demonstrou que os extratos etanólicos brutos das folhas e caules de *P. aduncum* L., nas concentrações de 100 µg/mL, não apresentam efeitos citotóxicos frente a alguns tipos de células humanas normais.

Em contrapartida ao efeito esquistossomicida do extrato diclorometânico das folhas e inflorescências de *P. aduncum* L., o extrato diclorometânico dos caules e os extratos aquosos, tanto dos galhos quanto das folhas, de *P. aduncum* L. não foram capazes de provocarem qualquer tipo de alteração nos vermes adultos quando avaliados na concentração de 100 µg/mL (CARRARA et al., 2013). Neste mesmo estudo, foi observado que os extratos diclorometânicos e aquosos das folhas e dos galhos de *P. arboreum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. xylosteoides*, *P. hispidum* não apresentaram atividade esquistossomicida *in vitro*.

Considerando a atividade esquistossomicida do extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L. na concentração de 200 µg/mL, e a ausência de trabalhos que explorem o potencial esquistossomicida do extrato diclorometânico das inflorescências de *P. aduncum* L, este extrato foi submetido à partição líquido-líquido, obtendo-se as frações hexânica (**PaI-Fh**), clorofórmica (**PaI-Fc**) e em acetato de etila (**PaI-Fa**). Estas frações foram então avaliadas *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, no intuito de identificar a fração com melhor atividade. Os resultados quanto à atividade esquistossomicida *in vitro* das frações estão apresentados na tabela 14.

**Tabela 14.** Atividade esquistossomicida *in vitro* das frações clorofórmica (**PaI-Fc**), hexânica (**PaI-Fh**), e em acetato de etila (**PaI-Fa**) do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>Controle</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>PaI-Fc</b> 200 µg/mL	24	0	0	50	0	50
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>PaI-Fh</b> 200 µg/mL	24	0	0	20	0	20
	48	0	0	50	0	50
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>PaI-Fa</b> 200 µg/mL	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes; <sup>b</sup> Meio RPMI; <sup>c</sup> DMSO em meio RPMI.

Tendo em vista os resultados obtidos, observa-se que a fração **PaI-Fc** (fração clorofórmica), na concentração de 200 µg/mL, foi capaz de provocar morte, alterações tegumentares e redução da atividade motora em 100% dos vermes adultos, após 48 h de incubação.

Já a fração **PaI-Fh** ocasionou morte, alterações tegumentares e redução da atividade motora em 100% dos parasitos somente após 72 h de incubação. Em contraste à atividade esquistossomicida das frações **PaI-Fc** e **PaI-Fh**, a fração **PaI-Fa**, na mesma concentração, não foi capaz de causar qualquer tipo de alteração nos vermes adultos de *S. mansoni*.

O estudo bioguiado de extratos e frações orgânicas é de grande valia, uma vez que direciona o trabalho fitoquímico para a identificação de substâncias bioativas. Neste contexto, estudos fitoquímicos bioguiados têm sido realizados no intuito de isolar substâncias com atividade esquistossomicida. Como exemplo, temos o trabalho realizado por LYDDIARD e

colaboradores (2002), o qual demonstra o isolamento de alguns isoflavonoides (alpinumisoflavona, dimetilalpinumisoflavona e ácido robústico), com atividade esquistossomicida *in vitro*.

Além deste, podemos ressaltar ainda o trabalho realizado por MALEK e colaboradores (2011) que, por meio de fracionamento cromatográfico biomonitorado, resultou no isolamento das saponinas equinosídeos A e B com expressiva atividade esquistossomicida *in vitro*,

Diante ao exposto, a fração **PaI-Fc** ativa foi a selecionada para dar prosseguimento ao estudo fitoquímico, no intuito de isolar substâncias com potencial atividade esquistossomicida.

#### **4.2.2 Atividade esquistossomicida *in vitro* das substâncias isoladas da fração PaI-Fc das inflorescências de *P. aduncum***

As substâncias isoladas da fração **PaI-Fc**, pinocembrina (**PaI-Fc-C5**<sub>(10-14)</sub>), uvangoletina (**PaI-Fc-C6**<sub>(26-29)</sub>) e cardamonina (**PaI-Fc-C6**<sub>(30-35)</sub>), inicialmente na concentração de 100 µM, foram avaliadas quanto à atividade *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados são expressos a seguir, na tabela 15.



**Tabela 15.** Atividade esquistossomicida *in vitro*, frente a vermes adultos de *S. mansoni*, das substâncias isoladas da fração clorofórmica (pinocembrina, uvangoletina e cardamonina) obtida a partir do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>Controle</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>Pinocembrina 100 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
<b>Uvangoletina 100 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	10	60	40	100	0
	120	40	0	100	60	40
<b>Cardamonina 100 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes; <sup>b</sup> Meio RPMI; <sup>c</sup> DMSO 0,5% em meio RPMI.

Conforme observado na tabela 15, a pinocembrina, 5,7-dihidroxi-flavanona, na concentração de 100 µM, não foi capaz de promover qualquer tipo de alteração na mortalidade, atividade motora e tegumento dos parasitos. Com relação à atividade antiparasitária da pinocembrina, RUIZ e colaboradores (2011) observaram que esta substância também não possui atividade leishmanicida quando avaliadas frente às formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (IC<sub>50</sub> > 40 µM).

Apesar da pinocembrina não possuir atividade esquistossomicida *in vitro*, esta substância apresenta atividade antibacteriana frente às cepas resistentes de *Neisseria gonorrhoeae* (RUDDOCK et al., 2011) e expressiva atividade antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides* e a *C. sphaerospermum* (LAGO et al., 2009).

Já a uvangoletina (2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-diidrochalcona), na concentração 100 µM, foi capaz de provocar morte e alterações tegumentares em 40% dos vermes adultos

somente após 120 h de incubação. Além disso, esta substância reduziu a atividade motora de forma significativa em 100% dos parasitos após 120 h de incubação.

A motilidade é um importante parâmetro a ser avaliado, pois sua inibição *in vitro* pode ser um indicativo da presença de efeito esquistossomicida *in vivo*. Isto porque a contratilidade muscular normal é um fator essencial para que os vermes adultos de *S. mansoni* se mantenham afixados, pelas ventosas, às paredes das vênulas mesentéricas. Desta forma, quando a paralisia é induzida, os casais de vermes se desprendem das vênulas e são carregados passivamente até o fígado, onde, se permanecerem por tempo suficiente, são eliminados pela resposta imune do hospedeiro (ANDREWS, 1985; CIOLI et al., 1995; WOOLHOUSE, 1979).

Há poucos estudos que avaliam as atividades biológicas da uvangoletina, dentre eles podemos resaltar a atividade antifúngica frente a duas linhagens de fungos patogênicos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (MIC= 2 µg) e *Botrytis cinerea* (MIC= 100 µg) (ÁVILA et al., 2011).

Dentre as atividades biológicas já realizadas com uvangoletina, observa-se a ausência de trabalhos que explorem seu potencial antiparasitário, uma vez que já há estudos que evidenciam a atividade leishmanicida e antimalárica de diidrochalconas (HERMOSO et al., 2003; PORTET et al., 2007).

Já a cardamonina evidenciou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro*, sendo capaz de matar, reduzir a atividade motora e provocar alterações tegumentares significativas em 100% dos vermes em apenas 24 horas de incubação, quando avaliada na concentração de 100 µM.

Considerando os estudos já realizados com chalconas, sugere-se que a melhor atividade esquistossomicida *in vitro* da cardamonina, em relação à uvangoletina, seja atribuída à presença da insaturação  $\alpha$ ,  $\beta$  carbonílica, a qual promove conjugação entre os grupos arilas, a qual parece ser responsável por uma série de atividades biológicas destes compostos, como a atividade leishmanicida, antimalárica, antiviral, antifúngica e antibacteriana (SANTOS, 2008; SAHU et al., 2012).

Corroborando com o potencial antiparasitário da cardamonina, RUÍZ e colaboradores (2011) demonstraram que esta substância também possui significativa atividade *in vitro* frente às formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, apresentando IC<sub>50</sub> de 8 µg/mL.

Ainda, podemos ressaltar que a cardamonina possui propriedades anti-inflamatórias por inibir a produção TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e a expressão da iNOS (isoforma

induzível da óxido nítrico sintase), induzida por LPS (lipopolissacarídeo) (HATZIIEREMIA et al., 2006).

Evidências científicas revelam que outras substâncias isoladas de espécies do gênero *Piper* também possuem atividade significativa esquistossomicida. Neste contexto, MORAES e colaboradores (2012b) observaram que a piplartina (na concentração de 15,8  $\mu\text{M}$ ), uma amida encontrada em *P. tuberculatum*, foi capaz de provocar a morte de todos os vermes adultos de *S. mansoni*, além de induzir alterações tegumentares nos parasitos.

Podemos ressaltar ainda o trabalho que culminou em patente, no qual se detectou atividade esquistossomicida, tanto *in vitro* quanto em *in vivo*, para a metilcubebina, uma lignana dibenzilbutirolactona isolada de *P. cubeba* (Patente PI 0503951-7).

#### **4.2.3 Avaliação do efeito esquistossomicida *in vitro* da 2',4'- dihidroxi-6'-metoxi-chalcona (cardamonina) em diferentes concentrações**

Devido à atividade esquistossomicida apresentada pela cardamonina, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , esta foi avaliada em outras diferentes concentrações (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ). Os resultados estão expressos a seguir, na tabela 16.

**Tabela 16.** Atividade esquistossomicida da cardamonina em diferentes concentrações frente a vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
<b>Controle</b> <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>DMSO 0,5%</b> <sup>c</sup>	24	0	0	0	0	0
<b>Cardamonina 100 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Cardamonina 50 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Cardamonina 25 µM</b>	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
<b>Cardamonina 10 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	70	0	0	0
	96	0	100	0	100	0
	120	100	0	100	0	100
<b>Cardamonina 5 µM</b>	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes; <sup>b</sup> Meio RPMI; <sup>c</sup> DMSO em meio RPMI

A partir dos dados descritos na tabela anterior, observa-se que a cardamonina mesmo na concentração quatro vezes menor (25 µM) que a utilizada na triagem inicial (100 µM) foi capaz de causar redução significativa da atividade motora e alterações tegumentares significativas, além de provocar a morte de 100% dos vermes adultos após 24 horas de incubação.

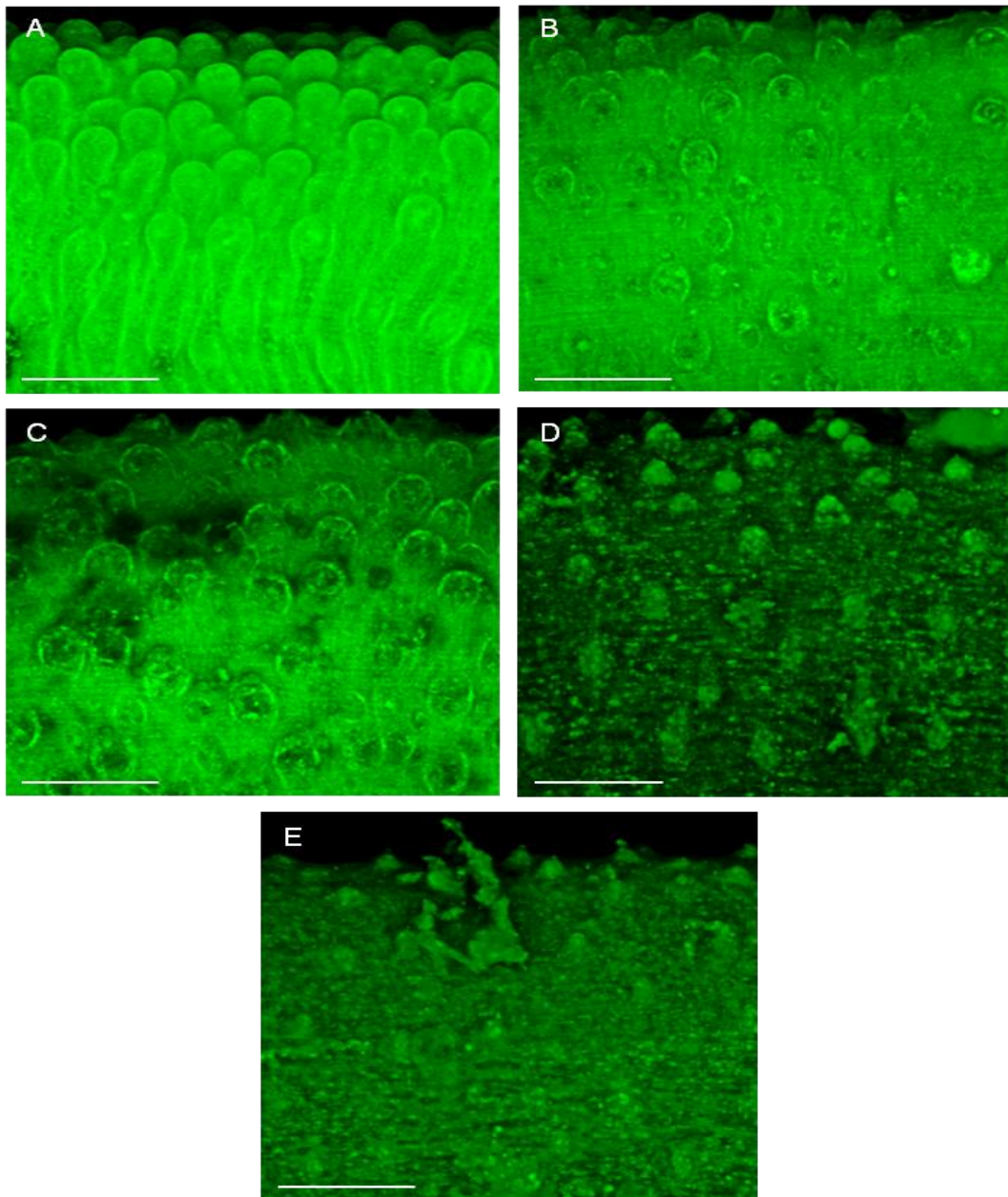
No entanto, a cardamonina (25  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de provocar a morte de 100% dos parasitos somente após 120 horas de incubação. Por outro lado, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , esta substância não provocou qualquer alteração nos vermes adultos.

Estudos anteriormente realizados demonstraram que outras substâncias isoladas de extratos vegetais também possuem expressiva atividade esquistossomicida *in vitro*. Como, por exemplo, os triterpenos balsaminol F e karavilagenina C, os quais promoveram a morte de 100% dos vermes adultos na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (RAMALHETE et al., 2012).

Além destes, outro estudo mostra a atividade esquistossomicida *in vitro* da curcumina, um diarilheptanoide, que também foi capaz de matar todos os vermes adultos, mesmo na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (EL-SHERBINY et al., 2006).

Assim, os resultados experimentais obtidos quando comparados aos da literatura (EL-SHERBINY et al., 2006; PEREIRA et al., 2011; RAMALHETE et al., 2012) reforçam o grande potencial esquistossomicida da cardamonina, o que corrobora ainda mais com o ineditismo neste estudo.

No intuito de se realizar uma análise detalhada sobre o efeito da cardamonina sobre o tegumento do *S. mansoni*, os parasitos foram fixados em solução AFA e analisados em microscopia confocal de varredura a laser (Figura 24).



**Figura 24.** Efeito da cardamonina no tegumento de vermes adultos machos de *S. mansoni*. Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo a substância em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitos foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal de varredura a laser. **A:** controle negativo (sem adição da substância). **B:** controle positivo (praziquantel 10  $\mu\text{M}$ ). **C:** 10  $\mu\text{M}$ . **D:** 25  $\mu\text{M}$ . **E:** 50  $\mu\text{M}$  da cardamonina. **A-E:** Imagens tridimensionais. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

A análise dos dados da figura 24 permite concluir que os danos tegumentares provocados pela cardamonina são diretamente dependentes da concentração avaliada, uma vez que na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (Imagem E) os danos aos tubérculos foram mais evidentes do que aqueles observados na menor concentração (10  $\mu\text{M}$ , imagem C).

A superfície do *S. mansoni* é constituída por um complexo sincicial que representa a principal rota de absorção de nutrientes, excreção de metabólitos e proteção ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Assim, o tegumento representa um alvo crucial de ação dos fármacos esquistosomicidas (FREZZA, 2012; RIBEIRO, 2011).

Neste contexto, diversos trabalhos têm avaliado o efeito de substâncias esquistosomicidas sobre o tegumento de *S. mansoni*. Dentre estes, podemos destacar as alterações tegumentares causadas pela pipartina, metilcubebina e pela mistura racêmica de ( $\pm$ )-licarina A (MORAES et al., 2011a, 2012b; MAGALHÃES et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

Por outro lado, além da ação sobre o tegumento, a expressiva atividade esquistosomicida *in vitro* da cardamonina pode estar associada a uma possível citotoxicidade desta substância, já que ADEROGBA e colaboradores (2011) observaram efeito citotóxico desta chalcona ( $\text{LC}_{50} = 1,97 \mu\text{g/mL}$ ) frente a células Vero (linhagem de células de rim de macaco verde africano). Entretanto, faz-se necessário, estudos adicionais comparativos confrontando sua possível citotoxicidade com a sua atividade esquistosomicida frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

Sendo assim, outros estudos estão sendo realizados, incluindo o de citotoxicidade, bem como o experimento que avalia a porcentagem de inibição da atividade enzimática da ATP-difosfohidrolase frente à cardamonina, no intuito de esclarecer os possíveis mecanismos de ação desta substância.

## 5 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* L. (**PaI**) resultou no isolamento e identificação da pinocembrina, uvangoletina, cardamonina e pinostrobrina ou alpinetina. Dentre os metabólitos isolados, o presente estudo relata pela primeira vez a presença da diidrochalcona uvangoletina (**PaI-Fc-C6** <sup>(26-29)</sup>) e da chalcona cardamonina (**PaI-Fc-C6** <sup>(30-35)</sup>) nesta espécie.

O extrato diclorometânico bruto das inflorescências de *P. aduncum* apresentou atividade esquistossomicida *in vitro*, corroborando com o potencial esquistossomicida de extratos vegetais de espécies do gênero *Piper*.

Já as frações clorofórmica (**PaI-Fc**) e hexânica (**PaI-Fh**), provenientes do extrato bruto, demonstraram atividade esquistossomicida *in vitro*, enquanto a fração em acetato de etila (**PaI-Fa**), na concentração avaliada, não foi ativa frente aos vermes adultos de *S. mansoni*.

Em relação à atividade esquistossomicida *in vitro* das substâncias isoladas das inflorescências de *P. aduncum* L., a cardamonina foi a mais ativa, enquanto a uvangoletina demonstrou-se pouco ativa e a pinocembrina inativa nas concentrações avaliadas.

Assim, associado ao estudo fitoquímico, a triagem do extrato e fração ativa, utilizando o parâmetro de mortalidade no ensaio *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, mostrou-se eficiente no sentido de direcionar o estudo fitoquímico para o isolamento de substâncias ativas frente a este parasito.

Além disso, a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto, bem como da fração clorofórmica está relacionada, pelo menos em parte, com a atividade esquistossomicida demonstrada pela cardamonina.

Finalmente, a análise dos dados obtidos sugere que a cardamonina exerce seu efeito esquistossomicida *in vitro* principalmente sobre o tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados com esta chalcona, a fim de conhecer os mecanismos de ação desta substância sobre os vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados obtidos neste estudo, aliados aos já alcançados pelo nosso grupo de pesquisa, mostram o grande potencial de chalconas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas.



---

## 6 REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANIET, R.; LOUTFY, N.; SAHN, A.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. **Journal of Parasitology Research**, v. 104, p. 955–965, 2009.

ACHAN, J.; TALISUNA, A.O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J.K.; BALIRAINÉ, F.N.; ROSENTHAL, P.J.; D' ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, 2011.

ADROGBA, M.A.; KGATLE, D.T.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Isolation of antioxidant constituents from *Combretum apiculatum* subsp. *Apiculatum*. **South African Journal of Botany**. v.79, p. 125-131. 2012.

AGUIAR, G.P.; MELO, N.I.; WAKABAYASHI, K.A.L.; LOPES, M.H.S.; MANTOVANI, A.L.L.; DIAS, H.J.; FUKUI, M.J.; KELES, L.C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; SILVA-FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; MAGALHAES, L.G.; CROTTI, A.E.M. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil from the flowers of *Bidens sulphurea* (Asteraceae). **Natural Product Research**, 2012.

ALVES, H.S. **Novos flavonoides monoterpênico e outros constituintes químicos isolados de espécies de Piper (Peperaceae)**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal do Paraíba. 2008.

AMARAL, R.S.; TAUIL, P.L.; LIMA, D.D.; ENGELS, D. Na Analysis of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006.

ANDREWS, P. Praziquantel: Mechanisms of anti-schistosomal activity. **Pharmacology Therapeutics**. v. 29, p. 129-156, 1985.

ARAÚJO, M. J. C.; CÂMARA, C.A.G.; BORN, F.S.; MORAES, M.M.; BADJI, C.A. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 2, p. 139-155, 2012.

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

ÁVILA, M.C.; PATINO, O.J.; PRIETO, J.A.; DELGADO, W.A.; CUCA, L.E. Antifungal flavonoids isolated from *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). **Órganica y Bioquímica**. v.40, 2011.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, C.M.; FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do Óleo de *Piper aduncum* no Controle em Pós-Colheita de *Colletotricum musae* em Banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.

BATISTA JR, J.M.; LOPES, A.A.; AMBRÓSIO, D.L; REGASINI, L.O.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; CICARELLI, R.M.B.; FURLAN, M. Natural Chromenes and Chromene Derivatives as Potential Anti-trypanosomal Agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 538-540, 2008.

BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.

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

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed, 2010. Acesso: 10/03/2013. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia\\_vigilancia\\_epidemiologia\\_2010\\_web.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemiologia_2010_web.pdf).

BURKE, B. & NAIR, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruit of Jamaican *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1427-1430, 1986.

CAIXETA, S. C.; MAGALHÃES, L. G.; DE MELO, N. I.; WAKABAYASHI, K. A. L.; de P. AGUIAR, G.; de P. AGUIAR, D.; MANTOVANI, A. L. L.; ALVES, J. M.; OLIVEIRA, P. F.; TAVARES, D. C.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CROTTI, A. E. M. Chemical composition and in vitro schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in southeast Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 11, p. 2149–2157, 2011.

CARRRARA, V.S.; VIEIRA, S.C.H.; PAULA, R.G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L.G.; CORTEZ, D.A.G.; DA SILVA FILHO, A.A. *In vitro* schistosomicidal effects of *Piper* species and an amide from *Piper amalago* (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, p. 1-6, 2013.

CHAURET, D. C.; BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T.; DURST, T.; KRISHNAMURTY, H.G.; SANCHEZ-VINDAS, P.; MORENO, N.; SAN ROMAN, L.; POVEDA, L. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 152-155, 1996.

CHEENPRACHA, S.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; SUBHADHIRASAKUL, S.; TEWTRAKUL, S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1710-4, 2006.

- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The Global Status of Schistosomiasis and its Control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 41-51, 2000.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 221–249, 2002.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. 53-59, 2003.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: Past, present ... and future?. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 35–85, 1995.
- DA SILVA FILHO, A.A. **Estudo fitoquímico, de cultivo e das atividades biológicas de Baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae), a principal fonte botânica de própolis verde**. 2006. 188p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- DA SILVA FILHO, A.A.; RESENDE, D.O.; FUKUI, M.J.; SANTOS, F.F.; PAULETTI, P.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; GREGÓRIO, L.E.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARA, N.P. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-4782, 2009.
- DE CASTRO, C. C.; DIAS, M. M; PESSOA DE REZENDE, T.; MAGALHÃES, L. G.; DA SILVA FILHO, A. A. Natural Products with Activity Against *Schistosoma Species*. Chapter 8. In: MA HENDRA KUMAR RAI E KATERYNA VOLODYMYRIVNA KON (Org.). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Componentst**. Londres: 1. ed. Elsevier, 2013. p. 109-134.
- DE MELO, N.I.; MAGALHAES, L.G.; de CARVALHO, C.E.; WAKABAYASHI, K.A.; de P. AGUIAR, G.; RAMOS, R.C.; MANTOVANI, A.L.; TURATTI, I.C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.; CROTTI, A.E. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 762-773, 2011.
- DE WALICK, S.; TIELENS, A.G.M.; VAN HELLEMOND, J.J. *Schistosoma mansoni*: The egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 7-13, 2012.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. 1986.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3a ed., New York: Wiley, 2009.
- DI WU, M.G.; NAIR, D.L.D. Novel compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) roots and their effect on cyclooxygenase enzyme. **Phytochemistry**. v. 50, p. 701-5, 2002.

- DÍAZ, P.P.; ARIAS, T.; JOSEPH-NATHAN, P. A chromene an isoprenylated methylhydroxybenzoate and a C-methyl flavanone from the bark of *Piper hostmannianum*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 809-811, 1987.
- DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 659–667, 2008.
- DYER, L. A. & PALMER, A. N. *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. **Kluwer Academic Publishers**, New York. Cap. 7, 2004.
- EL-SAYED, M.M.; ABDEL-HAMEED, E.S.; EL-NAHAS, H.A., EL-WAKIL, E.A. Isolations and identification of some steroidal glycosides of *Furcraea selloa*, **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 478-482, 2006.
- EL-SHENAWY, N.S.; SOLIMAN, M.F.M.; REYAD, S.I. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 29-36, 2008.
- EL-SHERBINY, M.; ABDEL-AZIZ, M. M.; ELBAKRY, K. A.; TOSON, E. A.; ABBAS, A. T. Schistosomicidal effect of curcumin. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 1, n. 6, p. 627–633, 2006.
- FALLON, P.G.; STURROCK, R.F.; NIANG, A.C.; DOENHOFF, M.J. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 61–62, 1995.
- FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N. L.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, p. 51-57, jan. 2004.
- FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O. C.; GOMES, J. A. S.; ENK, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M. Z.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v.135, p. 943-953, mar. 2008.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA, M.S.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência Agratécnica**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA, M.S.; ALÉCIO, M.R. Toxicidade do óleo essencial de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotomia tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 484-489, 2005.

- FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, N. R.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 509 – 515, 2003.
- FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ANTUNES, C. M. F.; TAVARES, C. A. P.; DA CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 3, p. 190 – 196, 2003.
- FERREIRA, J.; PEADEN, P.; KEISER, J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1585–1592, 2011.
- FLORES, N., JIMÉNEZ, I.A.; GIMÉNEZ, A., RUIZ, G., GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I.L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**. v. 70, p. 621-627, 2009.
- FREZZA, T. F. **Ação de *Cordia verbenacea* sobre *Schistosoma mansoni***. 2012. Tese (Doutorado em Biologia, área de Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012.
- FRISCHKORN, C. G. B.; FRISCHKORN, H. E.; CARRAZZONI, E. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. **Naturwissenschaften**, v. 65, n. 9, p. 480-483, 1978.
- GÖNNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Parasitology Research**, v. 52, p. 129–150, 1977.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.368, p. 1106–1118 368, 2006.
- HATZIIEREMIA S, GRAY, AI, FERRO V, PAUL, A AND PLEVIN, R. The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NFB signalling pathways in monocytes/macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 188-198, 2006.
- HERMOSO, A.; IGNACIO A. JIMÉNEZ, ZULMA A. MAMANI, ISABEL L. BAZZOCCHI; JOSÉ E. PINERO, ANGEL G. RAVELOB AND BASILIO VALLADARESA. Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.11, p. 3975-3980, 2003.
- HOCKLEY, D. J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. **Advances in Parasitology**, v. 11, p. 233-305, 1973.
- HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. . Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.

- HUFFORD, C. D.; OGUNTIMEIN, B.O. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. **Phytochemistry**. v. 19, p. 2036-2038, 1980.
- IBIKOUNLÉ, M.; MOUAHID, C.; MINTSA NGUÉMA, R.; SAKITI, N.G.; KINDÉ-GASARD, D.; MASSOUGBODJI, A.; MONÉ, H. Life-history traits indicate local adaptation of the schistosome parasite *Schistosoma mansoni*, to its snail host, *Biomphalaria pfeifferi*. **Experimental Parasitology**, v. 132, 501-7, 2012.
- IBRAHIM, R.K. Flavonoids. **Nature**. 2001.
- ICHIMARU, M.; NAKATANI, N.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; MATHENGE, S.G.; JUMA, F.D.; NGANGA, J.N. Cytotoxic C-benzylated dihydrochalcones from *Uvaria acuminata*. **Chem Pharm Bull**. v. 52, p. 138-41, 2004.
- ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L.F.; BENNETT, J.L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 214–218, 1996.
- ISMAIL, M.M.; TAHA, S.A.; FARGHALY, A.M.; EL-AZONY, A.S. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, p. 685–695, 1994.
- ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi.**, v.122, n.4, p. 291-294, 2002.
- JOSHI, A. S.; , A. C. NIMROD<sup>1</sup>, H. N. ELSOHLY; L. A. WALKER<sup>1</sup>, A. M. CLARK. Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. **Planta Medica**. v.67, p. 186-188. 2001.
- KATZ, N.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J.; MENDES, N.M.; ROCHA FILHO, P.A.; ARAUJO, N. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, p. 381–387, 1973.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v, 90, p. 55–62, 2003.
- KONÉ, W.M.; VARGAS, M.; KEISER, J. Anthelmintic activity of medicinal plants used in Côte d'Ivoire for treating parasitic diseases. **Parasitology Research**, 2011.
- KOORBANALLY, N.A.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; MULHOLLAND, D.A.; VAN UFFORD, L.Q.; VAN DEN BERG, A.J. Chalcones from the seed of *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). **Phytochemistry**. v. 62, p. 1225-9, 2003.
- KRISHNA, B. M. & CHAGANTY, R. B; Cardamonin and alpinetin from the seeds of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**. p. 149-153. 1972.
- KUNZ, W. Schistosome male–female interaction: induction of germ-cell differentiation. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 227–231, 2001.

LAGO, J.H.G.; CHEN, A.; YOUNG, M.C.M.; GUIMARÃES, E.F.; OLIVEIRA, A.; KATO, M.J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *Piper hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 96-98, 2009.

LAGO, J.H.G.; ITO, A.T.; FERNANDES, C. M.; YOUNG, M.C.; MASSUO, J.K. Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity. **Natural Product Research**. v. 26, 2012.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASSANOVA, D.C.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**. v. 67, 2004.

LAGO, J.H.G.; YOUNG, M.C.M.; REIGADA, J.B.; SOARES, M.G.; ROESLER, B. P.; KATO, M.J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**. v.5, p. 1222-1224, 2007.

LEPS, J.; NOVOTNY, V.; CIZEK, L.; MOLEM, K.; ISUA, B.; BOEN, W.; KUTIL, R.; AUGA, J.; KASBAL, M.; MANUMBOR, M.; HIUK, S. Successful invasion of the neotropical species *Piper aduncum* in rainforests in Papua New Guinea. **Applied Vegetation Science**, v. 5, p. 255 – 262, 2002.

LI PAN, S.M.; LANTVIT, D.D.; ZHANG, X.; NINH, T.N.; CHAI, H.; DE BLANCO, J.C.; SOEJARTO, D.D. Bioassay-guided isolation of constituents of *Piper sarmentosum* using a mitochondrial transmembrane potential assay. **Journal of Natural Products**. v. 74, p. 2193-9, 2011.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247 – 253, 2009.

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

LÓPEZ, A.; MING, D.S.; TOWERS, G.H.N. Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. **Plant Biochemistry**. v. 65, p. 62-64, 2001

LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 163–170, 2002.

MABBERLEY, D. J. The Plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University. Press. New York, 1997.

MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; GOMES, D.C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 43-84.

MAGALHÃES, C.G. **Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica.** Tese (Doutorado). Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

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

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

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

MAIA, J.G.S.; ZOHHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; da SILVA, M.H.L.; LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 269-272, 1998.

MAKANGA, M.; KRUDSOOD, S. The clinical efficacy of artemether/lumefantrine (Coartem®). **Malaria Journal**, v. 8, 2009.

MALEK, S.N.A.; PHANG, C.W.; IBRAHIM, H.; WAHAB, N.A.; SIM, K.S. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Alpinia mutica* Rhizomes. **Molecules**. v.16, 2011.

MARTINS, R.C.C.; LAGO, J.H.G.; ALBURQUERQUE, S.; KATO, M.J. Tripanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsiamum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D. P. (Org). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. 11.ed. cap. 22. p. 193-212.

MESQUITA, J.M.O; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.1, p. 6-12, 2005.

MISNI, N.; OTHMAN, H.; SULAIMAN, S. The effect of *Piper aduncum* Linn. (Family: Piperaceae) essential oil as aerosol spray against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 249-258, 2011.

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



- MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- MORAES, J. ; NASCIMENTO, C. ; LOPES, P.O.M.V. ; NAKANO, E., YAMAGUCHI, L.F. ; KATO, M.J. ; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**. V. 127, p. 357-64, 2011a.
- MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NACIMENTO, C.; YAMAGUSHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 301-309, 2013a.
- MORAES, J.; NACIMENTO, C.; YAMAGUSHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 222-227, 2012.
- MORAES, J.; NUNES, L. C. C.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; LIMA, T. C.; NAKANO, E.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anthelmintic activity of a natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, p. 253-258, 2013b.
- MORAES, J.; SILVA, M. P.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 77-82, 2009.
- MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A chromene from *Piper aduncum* L. **Phytochemistry**, v.48, n.6; p. 1075-1077, 1998.
- MORGAN, J.A.T.; DEJONG, S.D.; SNYDER, G.M.; LOKER, E.S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, n. 07, p. 211-228, 2001.
- MULLER, E.D. **Análise do potencial antimicrobiano, citotóxico e mutagênico de extratos e substâncias obtidas de diferentes espécies de *Piper***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2011, 80 p.
- NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDI, A.A.; ALÉCIO, A.C.; REGASINI; L.O.; BERGAMO; D.C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; MARQUES, M.O.M.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, p. 467-470, 2006.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural product as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Product**, v. 75, p. 311-335, 2012.

- OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.G.; OLIVEIRA, A.S.S.; JÚNIOR, I.M.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; JERALDO, V.L.S.; LINHARES, A.X.; ALLEGRETTI, S.M. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Schistosomiasis: **Progress Report 2001-2011 and Strategic Plan 2012-2020**. Genebra: WHO, 2013. Acesso: 10/03/2013. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78074/1/9789241503174\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78074/1/9789241503174_eng.pdf).
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO Model List of Essential Medicines**. Genebra: WHO, 2013. Acesso: 15/05/2013. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>.
- ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.
- ORJALA, J.; WRIGHT, A. D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 18-26, 1994.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n.4, p. 597-673, 1997.
- PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; DE SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.
- Patente PI 0503951-7**. SILVA, M. L. A. E.; ALBUQUERQUE, S.; RODRIGUES V.; PEREIRA JÚNIOR, O. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; SILVA, R.; BASTOS, J. K. (2004). Obtenção e atividade contra *Schistosoma* e nematóides de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas, tetraidrofurânicas, furofurânicas, dibenzociclooctânicas e ariltetralínicas isoladas de fontes naturais e obtidas por síntese total ou parcial.
- PAVIA, D.L.; KRIZ, G.S.; LAMPMAN, G.M. **Introdução À Espectroscopia** - Tradução da 4ª Edição Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, p. 233-290, 1968.
- PEREDA-MIRANDA, R. Methyl 4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) benzoate, Major Insecticidal Principle from *Piper guanacastensis*. **Journal of Natural Product**. v.60, p. 282-284, 1997.

- PEREIRA, A.C.; MAGALHÃES, L.G.; GONÇALVES, U.O.; LUZ, P.P.; MORAES, A.C.G.; RODRIGUES, V.; DA MATTA GUEDES, P.M.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKRA, N.P.D.; SILVA, M.L.A. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v.72, p. 1424-1430, 2011.
- PICA-MATTOCCIA, L.; DIAS, L. C. D.; MORONI, R.; CIOLI, D. *Schistosoma mansoni*: Genetic complementation analysis shows that two independent hycanthone/oxamniquine-resistant strains are mutated in the same gene. **Experimental Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 445–449, 1993.
- PICQUET, M.; VERCRUYSSSE, J.; SHAW, D.J.; DIOP, M.; LY, A. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in northern Senegal. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 90–93, 1998.
- PLATT, T. R.; BROOKS, D. R. Evolution of the Schistosomes (Digenea: Schistosomatoides): the origins of dioecy and colonization of the venous system. **Journal of Parasitology**, v. 83, n.6, p. 1035-1044, 1997.
- POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C. et al. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 97-105, 2004.
- PORTET, B.; FABRE, N.; ROZENBERG, R., HABIB-JIWAN, J.L.; MOULIS, C.; QUETIN-LECLERCQ. Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1210, p.45-54, 2008.
- POSSO, R.O.; DIAZ, P.P.; DE DIAZ, A.M.P. Estudio químico de *Piper steerni*. **Revista Colombiana de Química**. v. 23, 1994.
- QUÍLEZ, A.; BERENQUER, B.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; DE MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, L.F.; MARTÍN-CALERO, VIDARI, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**. v.128, p. 583-9, 2010.
- RAFAEL, M.S.; HEREIRA-ROJAS, W.J.; ROPER, J.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, 2008.
- RAJUDIN, E.; AHMAD, F.; SIRAT, H. M.; ARBAIN, D.; ENEIN, H. Y. A. Chemical constituents from tiger's betel, *Piper porphyphyllum* N.E.Br. (Fam. Piperaceae). **Natural Product Reserch**. v. 24, p. 387-90, 2010.
- RALI, T.; WOSSA, S.W.; LEACH, D.N.; WATERMAN, P.G. Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 389-394, 2007.

- RAMALHETE, C.; MAGALHÃES, L.G; RODRIGUES, V.; MULHOVO, S.; DA SILVA FILHO, A. A.; FERREIRA, M. J. In vitro schistosomicidal activity of balsaminol F and karavilagenin C. **Planta Medica**, v. 78, n. 18, p. 1-6, 2012.
- RAPADO, L.N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, F.P.; KATO, M.J.; YAMAGUCHI, L.F.; PEREIRA, C.A.B.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 66-72, 2011.
- REIGADA, J.B. **Bioprospecção em espécies de Piperaceae**, Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009, 133 p.
- RIBEIRO, C. M. **Estudo Proteômico de vermes adultos machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2011.
- RUDDOCK, P.S.; CHARLAND, M.; RAMIEZ, S.; LÓPEZ, A.; NEIL TOWERS, G.H.; ARNASON, J.T.; LIAO, M.; DILLON, J.A. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, v.38, p. 82-8, 2011.
- RUIZ, C.; HADDAD, M.; ALBAN, J.; BOURDY, G.; REATEGUI, R.; CASTILHO, D.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E.; ESTEVEZ, Y.; AREVALO, J.; ROJAS, R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. **Phytochemistry Letters**. v. 4, p. 363-66, 2011.
- SAHU, N.K.; BALBHADRA, S.S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D.V. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: **A Review Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 209-225, 2012.
- SALEH, M. M.; ZWAVING, J. H.; MALINGRÉ, T. M.; BOS, R. The essential oil of *Apium graveolens* var. *secalinum* and its cercaricidal activity. **Pharmaceutisch World Science**, v. 7, p. 277-279, 1985.
- SANTOS, L. **Síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico de derivados obtidos a partir de chalconas**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.
- SANTOS, T.G.; **Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Piper* e de *Baccharis semiserrata* dc**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Química. Universidade Regional de Blumenau. 2009.
- SAYED, A.A; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C.P.; WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v.14, p. 407-412, 2008.
- SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; MIMAK, Y; OOHARA, M.; FUKAU, Y. A chalcone derivative from the bark of *Lindera umbellata*. **Phytochemistry**. v. 27, p. 3937-3939, 1988.

- SILVA, K. E. R.; SILVA, R. M. F.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; ROLIM-NETO, P. J. Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 9 – 16, 2012.
- SILVA, W.C.; D'ARC RIBEIRO, J.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.
- SILVA, W.C.; MARTINS, J.R.S.; SOUZA, H.E.M.; HEINZEN, H.; CESIO, M.V.; MATO, M.; ALBRECHT, F.; AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 267-274, 2009.
- SIMÕES, M. C. M. **Detecção de polimorfismo de base única em etiquetas de seqüências expressas de *Schistosoma mansoni***. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2005.
- SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695-700, 1965.
- SOLOMONS, T.W.; FRYHLE, C.B. Química Orgânica. 10<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro, 2012.
- SOUZA, P.J.C.; BARROS, C.A.L.; ROCHA, J.C.S.; LIRA, D.S.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, J.G.S. Toxicological evaluation of the essential oil of *Piper aduncum* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 217-221, 2008.
- SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; FARIA JUNIOR, F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural\*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 9, p. 300-7, 2011.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. **Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum**, p.291, 2005.
- STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411– 425, 2006.
- TAMAN, A., RIBEIRO, P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, p. 42–50, 2011.
- TEIXEIRA, S.D. **Estudo Fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua Interação com Morcegos Frugívoros**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. 2003.
- TERREAUX, C.; GUPTA, M.P.; HOSTETTSMANN, K. Antifungal benzoic-acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**. v.49, p. 416-464, 1998

- TOMIO, T.A. **Atividade citotóxica e antitumoral dos extratos e compostos isolados de *Rapanea ferruginea* e *Piper aduncum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2011, 171 p.
- TONUCI, L. R. S.; de MELO, N. I.; Dias, H. J.; WAKABAYASHI, K. A. L.; AGUIAR, G. P.; AGUIAR, D. P.; MANTOVANI, A. L. L.; RAMOS, R. C.; GROppo, M.; RODRIGUES V.; VENEZIANI, R. C. S.; CUNHA, W. R.; SILVA-FILHO, A.A.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M. In vitro schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2012.
- TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective Effect of 2',6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, 1999.
- UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, p. 121 – 137, 2011.
- VANDERSTRAETE M.; GOUIGNARD, N.; CAILLIAU, K., MOREL, M.; LANCELOT, J. F. B.; DISSOUS, C. Dual Targeting of Insulin and Venus Kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for Novel Anti-schistosome Therapy. **Neglected Tropical Diseases**, 2013.
- VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; RESENDE-SOARES, F. A.; PENIDO, M. L. O.; COSTA, S. C. G.; COELHO, P. M. Z. Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetal and Cereal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-8, sept. 2008.
- VILA, R.; TOMI, F.; MUNDINA, M.; SANTANA, A.I.; SOLÍS, P.N.; ARCE, J.B.L.; GUPTA, M.P.; CASANOVA, J.; CANIGUERAL, S. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 67-69, 2005.
- WANKE, S.; JARAMILLO, M.A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M.-T.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 477-497, 2007.
- WOOLHOUSE, N.M. Biochemical and pharmacological effects in relation to the mode of action of antischistosomal drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 2413-2418, 1979.
- XIAO, X.; SI, X.; TONG, X.; LI, G. Preparation of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai* hayata by microwavw-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**. v.81, p. 265-269, 2011.
- YOUSIF, F.; HIFNAWY, M.S.; SOLIMAN, G.; BOULOS, L.; LABIB, T.; MAHMOUD, S.; RAMZY, F.; YOUSIF, M.; HASSAN, I.; MAHMOUD, K.; EL-HALLOUTY, S.M.; EL-GENDY, M.; GOHAR, L.; EL-MANAWATY, M.; FAYYAD, W.; EL-MENSHAWI, B.S. Large-scale *in vitro* screening of Egyptian native and cultivated plants for schistosomicidal activity. **Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)**, v. 45, p. 501–510, 2007.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M., CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2742-2748, 1995.