UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JOSÉ LUIS FERREIRA SÁ

AÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA, MOLUSCICIDA E ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO E SUAS FRAÇÕES DA CASCA DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* (RADDI)

Recife
2020

JOSÉ LUIS FERREIRA SÁ

AÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA, MOLUSCICIDA E ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO E SUAS FRAÇÕES DA CASCA DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* (RADDI)

Tese de doutorado apresentado para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Tereza Santos Correia
Coorientadora: Profª. Drª. Ana Maria Mendonça de A. Melo

Recife
2020

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Sá, José Luis Ferreira
Ação esquistossomicida, moluscicida e antitumoral do extrato bruto e suas frações da casca de *Schinus terenbinthifolia* (Raddi) / José Luis Ferreira Sá. – 2020.

165 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia
Coorientadora: Ana Maria Mendonça de A. Melo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.
Inclui referências.

1. Esquistossomose 2. Antioxidantes 3. Agentes antineoplásicos I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Melo, Ana Maria Mendonça de A. (coorient.) III. Título

616.963 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2022-084

JOSÉ LUIS FERAREIRA SÁ

AÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA, MOLUSCICIDA E ANTITUMORAL DO EXTRATO BRUTO E SUAS FRAÇÕES DA CASCA DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* (RADDI)

Tese de doutorado apresentado para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André de Lima Aires (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha família. Meus pais, José Ferreira Sá e Lucinda Soares Cassamá pelo amor incondicional, carinho, apoio moral e educação. Em especial a minha irmã Lucilina pelo carinho, confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Á Deus primeiramente, por tudo que tem feito na minha vida de conceder a paciência, humildade, tolerância e a oportunidade de vir ao Brasil para estudar e conhecer outras realidades. Pela proteção, força, coragem e ajuda de enfrentar momentos difíceis para conquista dos meus objetivos.

À minha família, em especial aos meus pais José e Lucinda, pelo amor incondicional, carinho, educação e apoio moral. Agradecer principalmente a minha irmã Lucilina pelo carinho confiança e respeito e para meu irmão caçula Antônio Alezio Ferreira Sá que encontra- se no Brasil pelo respeito carinho e consideração. Aos outros irmãos pelo carinho, respeito e preocupação: Joana Ferreira Sá, Alicelia Ferreira Sá, Omar Djalo, Josimar A. S. Cassamá. A minha adorada Filha e sobrinhos (as) pelo carinho, Lucilina Carina Ferreira Sá, Nadia Soraia, Youping Catarina, Junior, Chelcia, Renna e Yonara.

À minha orientadora Prof.ª Dr.ª Maria Tereza Santos Correia, pelo carinho, paciência, e pela oportunidade. Em especial a minha Prof.ª Dr.ª Ana Maria M. de Albuquerque Melo pelo carinho, paciência e por aprimorar cada vez mais o conhecimento científico sob a sua orientação. Desejo saúde e felicidade junto da sua família e que continua sendo cada vez mais humanista humilde e que conceda oportunidade a mais pessoas.

A Profª. Drª Márcia Vanusa da Silva pela atenção, carinho e admiração. E ao professor Amâncio pela admiração, amizade e atenção.

Ao departamento de Biofísica e Radiobiologia, ao departamento de Bioquímica e departamento de Farmácia e LIKA desta UFPE, pelo apoio na execução deste trabalho.

Á comunidade Guineense em Recife pela amizade e momento compartilhado, durante essa caminhada.

Aos amigos pelo incentivo, apoio moral e momentos de diversão: Clariovaldo, Januário, Eduardo Lourenço, Papa Sofre, Henriques, Yuri Augostinho, Julio Rodrigues, em especial Lassana Danfa, Dilena Balde Sanca pelo carinho, tolerância, harmonia e companheirismo. E aos meus queridos afilhados Dereck Guilherme e Enzo Renna.

Ao pessoal do laboratório pelo acolhimento, carinho, companheirismo, atenção e parceria: Dewson Rocha, Williams Sequeira, Hianna Fagundes Silva, Douglas Andrade, Maíra Vasconcelos, Ricardo, Vinicius, Ingrid e Katarine.

Também agradecer ao pessoal do laboratório de Farmagnosia do departamento de farmácia, pessoal do laboratório de Parasitologia da LIKA a pessoal do Laboratório da Biofisica e

Quimica pela atenção e apoio, Prof. Dr. Luiz Alberto, Prof. Dr. André Lima, Prof.ª Dr.ª Monica Camelo, Prof. Dr Paulo Euzebio, Profª Drª Adriana Fontes, Wesley Felix, Isabelle, Drª Julia Souza, Drª Magda Ferreira e Wliana.

Aos amigos do curso pela amizade: Aline, Drª Giselle e Drª Riciele.

A todos que de certa forma contribuíram para a realização deste projeto. Por fim, agradecer imensamente ao CAPES pelo suporte financeiro, durante quatros anos da execução do projeto.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença endêmica que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo. As principais estratégias de controle à doença consistem no tratamento de pessoas infectadas com *Schistosoma mansoni* e eliminação dos moluscos hospedeiros intermediários *Biomphalaria glabrata*. Por outro lado, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e para o tratamento e controle da doença a Organização mundial da saúde preconiza a escolha de mais de uma forma de terapêutica, cirurgia, radioterapia e terapia sistêmica. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade moluscicida, esquistossomicida e antitumoral do extrato bruto da casca de *Schinus terebinthifolia* (EB), da fração acetato de etila obtida de EB (FAE) e das frações denominadas F3-7 e F8-16 obtidas após cromatografia de FAE em Sephadex LH-20®. Foram realizados ensaios com vermes de *S. mansoni* em diferentes fases evolutivas, incubados por 120 horas com concentrações do extrato bruto e suas frações. Também foi feito ensaios de toxicidade e genotoxicidade com moluscos *B. glabrata*, além do ensaio ecotoxicológico com *Artemia salina* e avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia* foram letais para os moluscos adultos de *B.* glabrata, apresentando CL_{90} de 76,66 e 95,92 µg/mL após 24 e 48 horas de exposição e não apresentaram toxicidade ambiental. Para os esquistossômulos as concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL de EB e FAE causaram 100% da perda de motilidade ao longo do corpo, enquanto a F8-16, apresentaram 100% da perda de motilidade ao longo do corpo nas concentrações de 200 e 400 µg/mL e 91,11% na concentração de 100 µg/mL, em 120 horas de incubação. Para vermes jovens (21 dias), EB e FAE causaram 100% da perda de motilidade ao longo do corpo nas concentrações de 200 e 400 µg/mL. Nessas mesmas concentrações a F8-16, após incubação, 96.67 e 100% dos vermes jovens não apresentaram motilidade ao longo do corpo. E o EB causou 6,25 e 56,25% da perda de motilidade ao longo do corpo (score 0) nos vermes adultos expostos às concentrações de 200 e 400 µg/mL, respectivamente. Para as mesmas concentrações, FAE e F8-16, apresentaram perda de motilidade em 100% dos vermes adultos. Para atividade antitumoral, o EB, FAE, F3-7 e F8-16 apresentaram a CL_{50} de 81,47, 89,22, 80,27 e 234,46 µg / mL para as células de linhagem de tumor de câncer cervical (HeLa) e para a linhagem de tumor de câncer de mama (MDA) expostos ao EB, FAE, F3-7 e F8-16 a CL_{50} foi de 30,38; 21,85; 35,88 e 212,48µg/mL, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que o EB e suas frações se mostraram viáveis como moluscicida e antitumoral. O EB, FAE da casca de *S. terebinthifolia* mostraram-se viáveis como esquistossomicida de origem vegetal nas

concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL e para F8-16 nas concentrações de 200 e 400 µg/mL após 120 horas de incubação.
Palavras-chave: Esquistossomose; moluscicida; *Schistosoma*; *Biomphalaria;* Antitumoral; Antioxidante.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an endemic disease that affects more than 200 million people worldwide. The main strategies to control the disease consist in the treatment of people infected with Schistosoma mansoni and elimination of the intermediate host mollusks *Biomphalaria glabrata*. On the other hand, cancer is the second leading cause of death in the world and for the treatment and control of the disease the World Health Organization recommends the choice of more than one form of therapy, surgery, radiotherapy and systemic therapy. The general objective of this work was to evaluate the molluscicidal, schistosomicidal and antitumor activity of the crude extract of the bark of *Schinus terebinthifolia* (EB), of the ethyl acetate fraction obtained from EB (FAE) and of the fractions denominated F3-7 and F8-16 obtained after chromatography of FAE on Sephadex LH-20®. Tests were carried out with S. mansoni worms in different evolutionary phases, incubated for 120 hours with concentrations of crude extract and its fractions. Toxicity and genotoxicity tests were also carried out with *B. glabrata* molluscs, in addition to the ecotoxicological assay with *Artemia salina* and evaluation of antitumor activity in vitro. FAE and F8-16 from the shell of *S. terebinthifolia* were lethal to adult molluscs of *B. glabrata*, presenting CL90 of 76.66 and 95.92 µg / mL after 24 and 48 hours of exposure and did not present environmental toxicity. For schistosomules the concentrations of 100, 200 and 400 µg / mL of EB and FAE caused 100% of the loss of motility throughout the body, while the F8-16, showed 100% of the loss of motility throughout the body in the concentrations 200 and 400 µg / mL and 91.11% at a concentration of 100 µg / mL in 120 hours of incubation. For young worms (21 days), EB and FAE caused 100% loss of motility throughout the body at concentrations of 200 and 400 µg / mL. At these same concentrations, F8-16, after incubation, 96.67 and 100% of young worms did not show motility throughout the body. And EB caused 6.25 and 56.25% of loss of motility throughout the body (score 0) in adult worms exposed to concentrations of 200 and 400 µg / mL, respectively. For the same concentrations, FAE and F8-16, showed loss of motility in 100% of adult worms. For antitumor activity, EB, FAE, F3-7 and F8-16 had a LC50 of 81.47, 89.22, 80.27 and 234.46 µg / mL for cervical cancer tumor cell lines (HeLa) and for the breast cancer tumor (MDA) lineage exposed to EB, FAE, F3-7 and F8-16 the LC50 was 30.38; 21.85; 35.88 and 212.48µg / mL, respectively. Therefore, it can be concluded that EB and its fractions proved to be viable as a molluscicide and antitumor. EB, FAE of *S. terebinthifolia* bark proved viable as a schistosomicide of plant origin at concentrations of 100, 200 and 400 µg / mL and for F8-16 at concentrations of 200 and 400 µg / mL after 120 hours of incubation.

Keywords: Schistosomiasis; molluscicide; *Schistosoma*; *Biomphalaria*; Antitumor**;** Antitumor.

LISTA DE FIGURA

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Morfologia das diferentes fases evolutivas, ovo, miracidio, cercaria e verme adulto (maho e femea). 27
Figura 2 - Locais de prevalencia da Esquistossomose no Brasil. 29
Figura 3 - Ciclo biologico da Esqustossomose. 32
Figura 4 - Foto do molusco da especie Biomphalaria glabrata Say, 1818 35
Figura 5 - Foto de espécime de *Schinus terebinthefolia* (Aroeira de praia). 52
Figura 6- Cromatograma obtido por CLAE para EB (A); FAE (B) e F8-16 (C) obtidos da casca de *S. terebinhifolia* Redd. 66

ARTIGO 1

Figura 7- Espectros de varredura dos picos referentes à presença de ácido gálico e catequina na amostra evidenciados nas amostras da casca de *S. terebinthifolia* Raddi. 66
Figura 8- Hemócitos de B. glabrata após a exposição ao extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) de *Schinus terebinthefolia*. (A) Hemócito hialinócito com micronúcleo. (B) Hemócito granulócito binucleado. (C) Hemócitos granulócitos em apoptose. (D) Hemócitos hialinócitos trinucleado. (E) Hemócitos hialinócitos granulócito com granulação intense. (F) Hemócitos hialinócitos com vacúlos citoplasmatico. 69
Figura 9- Nucleóides do ensaio de cometa para os hemócitos expostos ao extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F816). A categoria 0 indica que não ocorreu danos, enquanto as categorias de 1 a 4 indicam dano em niveis crescents sobre o material genético. 72

ARTIGO 2

Figura 10- Resultados do efeito do EB, FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia* sobre viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.0001 comparação com grupo controle negativo. 106
Figura 11- MEV imagem do esquistossomulo do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementada por 24 horas; (b, 2.85 kx) a curvatura dorsal mostra a estrutura da superfície intacta e a topografia morfológica normal; (a, 1.88 kx) a imagem ampliada mostra

a região anterior com presença de espinhos (E) (c, 9.93 kx) a imagem ampliada mostra região inferior com presença de ventosa ventral (VV).....108
Figura 12- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao EB nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 1.94; 2.62 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 5.27 kx) a imagem ampliada mostra área com orifícios (O), bolhas (B) e redução de espinhos (RE); (c, 5.27 kx) a imagem ampliada mostra uma extensa área com orificios (EAO); (d, 5.10 kx) mostra a presença de sulco (S) e sulco profundo (SP); (f, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma extensa área de descamação (EAD) e sulcos profundos (SP).....108
Figura 13- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto a FAE nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 1.96; 1.66 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra área com orifícios (O), bolhas (B), área com sulco (AS) e sulco profundo (SP); (c, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma área com redução de espicula (RE), área com descamação (AD) e presença de bolhas; (d, 5.10 kx) mostra área com sulcos (AS), presença de bolhas, orificios e tegumento inchado (TI); (f, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma área com redução de espicula (RE), presença de bolhas (B), sulcos (s) e orificios (O). 109
Figura 14- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto a F8-16 nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 2.52; 6.83 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 4.32 kx) a imagem ampliada mostra presença de orifício (O), bolhas (B) e área com redução de espiculas (RE); (c, 8.07 kx) a imagem ampliada mostra uma área com descamação (AD) e presença de sulcos (S); (d, 10.00 kx) mostra a presença de subtegumento inchado (SI), bolha (B) e rompimento do subtegumento (RS); (f, 10.00 kx) a imagem ampliada mostra sulcos profundos (SP), sugimento de dobras coalescidas (DC) e rompimento de sutegumento (RS). 109
Figura 15- (a-c). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao controle positivo (PZQ) na concentração de 10 µM por 24 horas; (b; e, 2.52; 6.83 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 4.32 kx) a imagem ampliada mostra presença de orifício (O), bolhas (B) e área com redução de espiculas (RE); (c, 8.07 kx) a imagem ampliada mostra uma área com descamação (AD) e presença de sulcos (S); (d, 10.00 kx) mostra a presença de subtegumento inchado (SI), bolha (B) e rompimento do subtegumento (RS); (f, 10.00 kx) a imagem ampliada mostra sulcos profundos (SP), sugimento de dobras coalescidas (DC) e rompimento de sutegumento (RS).....110

Figura 16- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementada por 24 horas; (b, 819 x) região médiana do verme mostra a estrutura superficial intacta (RM); (a, 1.88 kx) em uma imagem ampliada da região anterior mostra a ventosa oral e ventral (VO; VV); (c, 1.88 kx) em uma imagem ampliada mostra região inferior sem alteração (RI).....111
Figura 17- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da EB da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 1.00kx) mostra à curvatura dorsoventral com sulcos profundo (SP) (b, 2.50kx) a parte anterior à ventosa oral mostra o tegumento com lesão focal (LF), bolhas (B) e sulcos profundos (c, 2.50kx) em imagem aumentada, região anterior a ventosa ventral mostra formação das bolhas (B) e orifícios no tegumento (O) (d, 500x), a região inferior mostra os solcos (S) na parte posterios e dorsal (f, 2.50kx) em uma imagem ampliada mostraextensa área com corrugação no tegumento (EAC) e orificio (O).....111
Figura 18- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da EB da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 1.00kx) mostra à curvatura dorsoventral com contração muscular (MC) (b, 2.50kx) em imagem aumentada região inferior mostra sulcos profundos na parte posterior (SP), (c, 2.50kx) região anterior do tegumento mostra erosão ao redor da ventosa oral (E) (d, 1.00kx), a região inferior mostra a contração muscular (CM) e formação de bolhas (B) (f, 5.00 kv) em uma imagem ampliada mostra sulco profundo (SP), orifícios (O) e bolhas (BR). 112
Figura 19- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da FAE da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 500x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 1.00kx) em uma imagem ampliada, a parte anterior do verme mostra o tegumento com sulcos profundos (SP), formação de bolhas (B) e descamação (D). (d, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região posterior do verme mostra uma extensa área de retração do tegumento (RT) e orifícios (O). (f, 5.00kx) em imagem ampliada, a parte inferior mostra a tegumento com sulcos (S), formação de bolha (B). 112
Figura 20- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da FAE da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 500x) mostra à curvatura dorsoventral com contração muscular (CM). (c, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região anterior à ventosa ventral mostra o tegumento com lesão focal (LF), (d, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região próxima a ventosa oral mostra tegumento com dobras coalescidas (DC), lesão focal (LF) e sulcos profundos (SP). (e, 1.00kx) em imagem ampliada, a região

dorsal mostra tegumento com sulcos (S) (f, 2.50kx) em uma imagem ampliada mostra uma extensa área do tegumento com orificios (EAO). 113
Figura 21- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da F8-16 da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 500 x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 1.00 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal do verme, mostra o tegumento com descamação (D) e sulcos profundos (SP), (c, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região dorsal do verme mostra formação da bolha (B) e uma extensa área do tegumento com orificios (EAO) (e, 5.00 kx) em imagem aumentada, a região anterior do verme no a ventosa ventral, mostra a descamação de tegumento (D) (f, 2.50 kv) em uma imagem ampliada, região próxima a ventosa oral mostra uma extensa área do tegumento com descamação (EAD). 113
Figura 22- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da F8-16 da casca S. terebinthifolia por 24 horas. (a, 100x) mostra à curvatura dorsoventral (c, 5.00 kx) em uma imagem ampliada, mostra erosão ao redor da ventosa oral (E) na parte posterior à ventosa oral mostra a formação da das bolhas (B), e na região anterior do verme, mostra contração muscular (CM). (d, 5.00 kx) em uma imagem ampliada, região dorsal mostra formação da bolha (B) e tegumento com orificios (O). (e, 2.50 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal mostra tegumento com sulcos profundos (SP) (f, 2.50 kx) em uma imagem ampliada, uma extensa área com retração do tegumento (RT).....114
Figura 23- (a-c). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao controle positivo (PZQ) na concentração de 10 µM por 24 horas; (b, 220 x) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento e contração muscular (CM); (a, 1000 x) a imagem ampliada mostra presença de bolhas (B), e erosão do tegumento ao redor da ventosa oral (ET); (c, 900 x) a imagem ampliada mostra uma área com erosão do tegumento (ET). 114
Figura 24- (a-c). MEV images do tegumento do verme adulto de *S. mansoni* do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementado com RPMI por 120 horas; (a, 55x) mostra canal ginecóforo (CG); (b, 250x) a parte anterior mostra as ventosas oral e ventral (VO; VV); (c, 1000x) a região dorsal ilusta os tubérculos (T), papilas ciliadas (Pc), papilas em forma de cúpula (PC), tegumento com dobras paralelas arranjadas (TD).....116
Figura 25- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL do EB da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 150 x) mostra à curvatura dorsoventral. (b, 500 x) mostra a região anterior do verme com ventosa oral e ventral. (c, 1.00 kx) em uma imagem aumentada mostra lesões focais na ventosa oral e descamação (LF) (d, 500

x) mostra a curvatura dorsolateral. (e, 1.00 kx) mostra a região dorsal com sulco (S). (f, 5.00 kx) em maior aumento a parte dorsal mostra o tegumento com danos nos tubérculos (DT) com redução de espicula, formação de bolhas (B) e danos nas dobras tegumentares (Dt).....116
Figura 26- (a-f). MEV imagem do verme adulto de S. mansoni exposto à concentração 400 µg/mL do EB da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 150 x) mostra à curvatura dorsoventral. (c, 1.00 kx) em uma imagem aumentada mostra lesões focais (LF) na região dorsal próximo à ventosa oral, erosão no tegumento da ventosa oral (ET) e dobra coalescida (DC). (d, 500 x) em uma imagem ampliada ilustra a região dorsolateral com descamação (D) e perda dos tubérculos (Pt). (f, 1000 x) em maior aumento a parte dorsal mostra erosão do tubérculo (Et) com redução de espícula (RE) e formação de bolhas (B). 117
Figura 27- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da FAE da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 50x) mostra à curvatura dorsolateral do verme (c, 1000x) em maior aumento da região dorsal, é exibido o tegumento com danos tubérculos (DT) com redução de espículas (RE) e bolhas (B), (d, 50 x) mostra a curvatura dorsoventral com danos no tegumento (f, 15 kv) mostra a formação de orifício, bolhas (B) e bolhas rompida (BR). 117
Figura 28- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da FAE da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 45x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 250x) a parte posterior à ventosa oral mostra o tegumento com lesões focais (LF) e descamação (D) (c, 500x) em imagem ampliada mostra formação das bolhas (B) e dobras coalescidas (DC), (d, 300 x) em uma imagem ampliada ilustra a região dorsolateral com sulcos, (e, 1000x) em imagem aumentada, a região dorsal mostra a bolha rompida (BR), erosão do tubérculo (ET) e redução de espículas (RE).....118
Figura 29- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da F8-16 da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 100x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 10.00kx) mostra a região dorsolateral com lesão no tegumento. (c, 10.00kv) a parte dorsal próxima à ventosa ventral mostra danos no tubérculo (DT) e redução de espículas (RE). (d, 1.00 kx) mostra lesão na região dorsal e inferior do verme (e, 5.00kx) em região inferior do verme, mostra a formação bolha no tegumento (B) e redução das espículas (RE). (f, 5.00 kx) em uma imagem ampliada mostra redução de espiculas (RE), danos nas dobras tegumentares (Dt) e porosidade no tegumento (PT).....118
Figura 30- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da F8-16 da casca S. terebinthifolia por 120 horas. (a, 500 x) mostra lesão focal (LF) e

sulcos (S) na região posterior da ventosa oral e ventral (b, 500x) a região dorsolateral do verme mostra o tegumento com sulcos profundos (SP). (c, 1.00 kx) em uma imagem ampliada mostra formação de bolhas (d, 2.50 kx) região dorsolateral mostra formação das bolhas (B). (e, 5.00 kx) em imagem aumentada, a região dorsal mostra a bolha rompida (BR) e danos nos tubérculos (DT) (f, 10.00 kx) em uma imagem ampliada mostra danos na dobra tegumentares (Dt) e redução das espiculas (RE).....119

Figura 31- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à PZQ 10 µM por 120 horas. (a, 100 x) mostra à curvatura dorsal (b, 1.00 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal do verme mostra descamação do tegumento (D) e sulcos (c, 2.50 kx) em imagem aumentada, a região dorsal mostra dobra tegumentar lisa (DtL), erosão dos tubérculos (ET) e perda de espículas (PE).....119

ARTIGO 3

Figura 32- Cromatogramas obtidos por CLAE para EB (A); FAE (B) e F8-16 (C) obtidos das cascas de *S. terebinthifolia* Radd.....133

Figura 33- Espectros de varredura dos picos referentes à presença de ácido gálico e catequina na amostra evidenciados nas amostras da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.....133

Figura 34- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células tumorais, HeLa- linhagem de tumor de câncer cervical, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas e F8-16 – fração rica em compostos fenólicos.....137

Figure 35- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células tumorais MDA- linhagem de câncer de mama, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas e F8-16 – fração rica em compostos fenólicos.....137

Figura 36- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células normais, células Vero- linhagem de células de macaco, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas.....138

LISTA DAS TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1- Resultados do perfil fitoquímico do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) obtidos das cascas de *S. terebinthifolia* Raddi. 65

Tabela 2- Teores de ácido gálico e catequina calculados nas amostras de *Schinus terebinthifolia* Raddi, obtidos por CLAE. 67

Tabela 3- Valores calculados da concentração letal da fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos das cascas de *S. terebinthifolia* Raddi.....67

Tabela 4- Resultados das alterações morfológicas de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato bruto, FAE e F8-16 de *Schinus terebinthefolius*.....70

Tabela 5- Resultados de dano genético em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos de Schinus terebinthefolius. 73

ARTIGO 2

Tabela 6- Scores de motilidade dos vermes esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* expostos à Praziquantel e extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação. 96

Tabela 7- Scores de motilidade dos vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni* expostos à Praziquantel e extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.98

Tabela 8- Resultados dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos ao extrato bruto da casca de S. terebinthifolia por 120 horas. 101

Tabela 9- Resultados dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à fração acetato de etila da casca de *Schinus terebinthifolia* por 120 horas.....102

Tabela 10- Resultados dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos à fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* por 120 horas. 104

Tabela 11- Resultados do desacasalamento dos vermes adultos expostos ao extrato bruto da casca de *Schinus terebinthifolia* e sua frações por 120 horas**.**.....105

ARTIGO 3

Tabela 12- Análises por cromatografia de camada delgada do extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos e saponinas da casca de *S. terebinthifolia* Raddi. 132

Tabela 13- Teores de ácido gálico e catequina calculados nas amostras de *Schinus terebinthifolia*, obtidos por CLAE. 134

Tabela 14- Teor de polifenóis totais (TPT) do extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia* Raddi. 134

Tabela 15- Resultados da concentração inibitória o extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia* Raddi. 135

Tabela 16- Atividade citotóxica do extrato bruto e suas frações da casca de *Schinus terebinthefolia* Raddi sobre linhagem tumorais humano, HeLa e MDA e células normais (Células vero). 136

LISTA DE ABREVIATURA

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Cm	Centímetro
Mm	Milímetro
ACE	Acetato de etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CL_{50}	Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Extrato bruto
FAE	Fração acetato de etila
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PARNA	Parque Nacional do Catimbau
TR	Tempo de Retenção
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 OBJETIVOS 24

1.1.1 Objetivos gerais 24

1.1.2 Objetivos específicos 24

2 REVISÃO DE LITERATURA 25

2.1 *SCHISTOSOMA MANSONI* 25

2.2 ESQUISTOSSOMOSE 27

2.3 CICLO DA ESQUISTOSSOMOSE 30

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE 32

2.5 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS 33

3 HISTÓRICO SOBRE ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE 36

4 ESQUISTOSSOMICIDAS E MOLUSCICIDAS 39

5 CÂNCER E FITOFÁRMACOS 45

6 *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* (RADDI) - Aroeira da praia 50

7 ARTIGO 56

8 CONCLUSÕES 144

REFERENCIAS 145

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica, endêmica e de grande repercussão social. Devido à alta prevalência, gravidade e complicação clínica, essa doença tem sido considerada um relevante problema de saúde pública em vários países tropicais e subtropicais (GRYSEELS et al., 2006; RASO et al., 2007; MORAES, 2011; PEREIRA FILHO et al., 2014). Estima-se que mais de 261 milhões de indivíduos estão infectados e cerca de 659 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco consideradas endêmicas (OMS, 2018; SILVA et al., 2019). A doença é encontrada em 78 países entre a Ásia, África, América Central, do Sul e Oriente Médio (RASO et al., 2007; UTZINGER et al. 2009; AIRES et al., 2014). Na América, o Brasil é considerado, o país com maior prevalência, estima-se que cerca de 30 milhões de indivíduos vivem em locais com risco de contaminação e dentre estes 6 a 8 milhões de indivíduos estão infectados (AMARAL et al., 2006; LAMBERTUCCI, 2010; GOMES et al., 2014; SOUZA et al., 2017).

O ciclo da esquistossomose começa com a eliminação das fezes, juntamente com ovos do parasito pelo indivíduo infectado, em local com água parada e pouco poluída, onde os caramujos vetores são encontrados (CASTRO, 2009). Os caramujos são infectados, pelo miracídio e após 4 semanas no corpo do molusco transforma-se em cercária, um único miracídio tem potencial de originar mais de 100.000 cercárias, que ao serem liberadas na água nadam a procura dos seus hospedeiros definitivos, ou seja, o homem ou outros mamíferos (CIDDIO et al,. 2015; NEVES, 2016).

Para o tratamento quimioterápico da esquistossomose, tem sido utilizado o Praziquantel (PZQ), esta droga tem se mostrado eficaz no controle da infecção em humanos (OMS, 2014; AIRES et al., 2014; NEVES, 2016). Apesar da sua eficiência e segurança, o uso generalizado desse medicamento tem desenvolvido resistência de algumas espécies de *Schistosoma* (ABDUL-GHANI et al., 2009; MORAES, 2011; AIRES et al., 2014). É importante ressaltar que o PZQ é eficaz apenas para as formas adultas de *Schistosoma*, portanto, não atua sobre o esquistossômulos, formas jovens deste verme (SABAH et al., 1986; UTZINGER et al., 2003, MORAES, 2011). Portanto, a procura de novas alternativas terapêuticas, em especial o uso de compostos de origem natural, tem se mostrado bastante promissora.

Vários programas de controle da esquistossomose estão sendo implementado em larga escala com intuito de erradicar essa parasitose (JATSA et al., 2015), porém indivíduos que vivem nas áreas de maior endemismo possuem um acesso ao suprimento de água muito precário, ou seja, a água é obtida de poços, açudes e cacimbas, locais onde

moluscos infectados pelo *S. mansoni* podem estar presentes (BARBOSA, 2015). No Brasil, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) juntamente com as Secretarias de Vigilância Sanitária dos estados e municípios, trabalham para o controle desta doença (CANTANHEDE et al., 2010; KATZ, 2018), porém a endemia persiste.

A interrupção do ciclo de vida do parasita é essencial para impedir a transmissão da doença. Além do tratamento quimioterápico de indivíduos infectados, faz-se necessária à utilização de meios alternativos de interrupção da transmissão através da redução de hospedeiros intermediários em locais endêmicos e a implementação de saneamento básico para evitar a contaminação hídrica (KING; BERTSCH, 2015).

No Brasil ocorrem dez espécies do gênero *Biomphalaria*, sendo três espécies hospedeiras naturais do *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (MS, 2008). O controle químico é utilizado para reduzir as populações destes hospedeiros intermediário sendo a Niclosamida o moluscicida recomendado pela OMS e ANVISA. Esta substância sintética, é muito eficaz no combate aos moluscos vetores, porém apresenta alto custo em sua aplicação, se decompõe sob luz solar e apresenta elevado nível de toxicidade para organismos não-alvo, como peixes, anfíbios e plantas (PARAENSE 1972; CARVALHO et al., 2008; REY, 2011; NEVES, 2016; FARIA et al., 2018). A procura por moluscicidas de origem natural, não tóxico ao meio ambiente e eficaz no combate aos moluscos adultos e à fase larval infectante do parasita se faz necessária, surgindo como alternativa aos compostos sintéticos (SANDERSON; BERTLETT; WHITFIEKD, 2002; MOHAMED METWALLY; MAHMOUD, 2005; SINGH et al., 2010; MORAES, 2011; FARIAS et al., 2018).

A busca por novos compostos para o controle da esquistossomose se intensificou sobre os produtos de origem natural, sendo observados na literatura diversos trabalhos que reportam o estudo da atividade anti-helmíntica e moluscicida de produtos naturais como plantas (SINGH et al., 2010; KIROS et al., 2014; MANDEFRO et al., 2017; FARIAS et al., 2018) e liquens (SILVA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2019)

Neste contexto, o *Schinus terebinthifolia* Raddi pertencente à família Anacardiaceae, conhecido popularmente como e aroeira-da-praia com ampla distribuição no Brasil e bastante encontrada no bioma caatinga tem sido investigado como uma alternativa para o tratamento e controle da esquistossomose (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA 2007; BENDAOUD et al., 2010; NAPOLEÃO et al., 2011; BARBIERI et al., 2014).

Outros estudos com extratos de origem natural também têm sido realizados no combate a diferentes patologias, como por exemplo, o câncer. Estas pesquisas têm como principal alvo, investigar a atividade antitumoral de produtos naturais oriundos de plantas. Sabendo-se que o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, e que o tratamento convencional como a quimioterapia pode ocasionar diferentes efeitos colaterais ao paciente, o desenvolvimento e descobertas de princípios ativos de plantas com função de combater as células tumorais sem causar tantos efeitos colaterais passou a ser importante para a terapêutica do câncer (MOLASSIOTIS et al. 2005; NEWMAN et al., 2003; CRAGG et al., 2013; IYER et al., 2013; MARKMAN et al., 2013; CHINEMBIRI et al., 2014; CÓRDOBA, 2017).

A espécie *S. terebinthifolia,* aroeira-da-praia, é utilizada popularmente como analgésico, antibacteriano, anti-inflamatório, anti-úlcerativo, antioxidante, antifúngico e repelente térmita, podendo ser promissora como antitumoral (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA 2007; BENDAOUD et al., 2010; NAPOLEÃO et al., 2011; BARBIERI et al., 2014).

Considerando a diversidade de uso terapêutico poupular desta planta nativa nesse trabalho se buscou avaliar a eficácia de preparações obtidas da casca de *S. terebinthifolia* no tratamento da *Schistosoma* e em diferentes fases do seu ciclo bem como de sua atividade antitumoralpara duas linhagens de células cancerígenas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

- Avaliar ação moluscicida, genotóxica, esquistossomicida, antitumoral e antioxidante do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* Raddi e suas frações.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar qualitativamente e quantitativamente, o perfil cromatográfico do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações por meio de CCD e HPLC.
- Investigar atividade esquistossomicida do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia*e suas frações e sobre vermes *S. mansoni*.
- Analisar alteração no tegumento dos vermes de *S. mansoni* expostos ao extrato brutoda casca de *S. terebinthifolia* e suas frações por meio de microscopia eletrônica;
- Avaliar atividade moluscicida contra os moluscos adultos de *B. glabrata* expostos às frações da casca de *S. terebinthifolia*;
- Verificar ação genotóxica da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações sobre os hemócitos *B. glabrata* por meio do teste do micronúcleo e ensaio cometa.
- Avaliar o mecanismo de ação do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações sobre os moluscos adultos *B. glabrata* por meio de teste de micronúcleo e ensaio de cometa.
- Verificar a ação ecotoxicológica das frações da casca de *S. terebinthifolia* por meio do bioensaio com o microcrustáceo, *Artemia salina*.

Identificar a atividade citotóxica "*in vitro"* do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações sobre as linhagens de células tumorais e não tumorais

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Schistosoma mansoni*

Parasitas do gênero *Schistosoma* fazem parte do Reino Animalia, filos Platyhelminthes, pertencem à classe Trematoda, subclasse Digenea; ordem Strigeidida; família Schistosomatidae (FERNANDES, 2014). As espécies dessa família possuem sexo separado, com dimorfismo sexual bem definido e são considerados helmintos de vaso sanguíneo de mamíferos, aves e alguns répteis (SCELL, 1970; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

As populações das regiões tropicais e subtropicais, principalmente, de países em desenvolvimento, são frequentemente afetadas por várias espécies de trematódeos, ou seja, são responsáveis por alta endemicidade da esquistossomose no mundo (CHITSULO et al., 2000; STEINMANN et al., 2006; MORAES, 2011).

O helminto do gênero *Schistosoma*, foi descrito por Bilharz em 1852, durante uma necropsia de um rapaz, chamando de *Distomum haematobium*. Mais tarde, weiland chamou o gênero deste verme *Schistosoma*. A espécie *Schistosoma mansoni* foi descrito por Sambon (1907) em Londres, ao analisar as amostras de fezes de indivíduos infectados. Nesta mesma época e de forma independente, no estado da Bahia, Brasil, o Dr. Pirajá da Silva também descreveu uma espécie de *Schistosoma* e a denominou de *Schistosoma americanum* (CARVALHO et al., 2008; NEVES, 2016).

De acordo com Neves (2016), a morfologia do gênero *S. mansoni* varia de acordo com a fase evolutiva do parasito (Figura 1): ovos, miracídios, esporocistos, cercarias vermes adultos (macho e fêmea).

No ovo, na sua forma madura, nota-se a presença de miracídios pela transparência da casca. Ele possui um comprimento de 150 µm por 60 µm de largura, tem formato oval e não possui opérculo; na porção mais larga exibe um espinho.

O miracídio tem tamanho médio de 160 a 180 µm de comprimento por 60 µm de largura, exibe formato redondo com células epidérmicas na qual os cílios são introduzidos, facilitando a motilidade dos miracídios no meio aquático.

As cercarias exibem um comprimento de aproximadamente 500 µm, cauda bifurcada medindo 230 por 50 µm e corpo cercariano com 190 por 70 µm. Apresentam duas ventosas, uma oral que exibe as terminações denominadas de glândulas de penetração e outra ventral (acetábulo). Esta última é superior à ventosa oral e exibe musculatura mais avançada (CARVALHO et al., 2008; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

Após a entrada das cercarias no hospedeiro definitivo, transcorre algumas modificações estruturais, essas alterações ocorrem devido à mudança do ambiente. Ademais, depois da perda da cauda, rapidamente o verme de *Schistosoma* gera uma camada de microvilosidade por cima de toda a extensão do tegumento, alterando a respiração, de aeróbica para anaeróbica, no entanto, produz uma sensibilidade à água e uma resistência ao sistema complemento, alterando o glicocálice e também alterando a membrana trilaminar para a heptalaminar. As modificações estruturais acima relatadas são necessárias para formar outra fase larval denominada de esquistossômulo, que se mantém por dois a três dias nos tecidos da derme. Após esse período, caso não sofram ação do sistema imune do hospedeiro, e sejam eliminados, os vermes jovens atingem a corrente sanguínea dos vasos cutâneos e percorrem em direção ao coração e pulmões através da circulação. Depois da segunda semana, os vermes podem ser encontrados no sistema porta intra-hepático, onde eles exibem pigmento hemático no intestino, crescem e se tornam vermes maduros após quarta semana (STIREWALT, 1974; REY, 2008, 2011; NEVES, 2016).

O macho adulto de *S. mansoni*, possui cor esbranquiçada, mede 1 cm de comprimento e é revestido por minúscula projeção denominada tubérculo. Exibe corpo separado em duas partes: anterior, onde pode ser encontrada a ventosa oral e ventral (acetábulo) e posterior na qual se encontra canal ginecóforo (dobras laterais do corpo no sentido longitudinal para hospedar a fêmea). A fêmea adulta possui 1,5 cm de comprimento, forma cilíndrica, cor mais escura que a do macho e extremidades afiladas, possuindo tegumento liso com discretas estrias paralelas. Na região anterior se encontra a ventosa oral e o acetábulo e no início da porção posterior observa-se em sequência a vulva, útero e o ovário. Toda porção posterior é preenchida pelas glândulas vitelógênicas (ou vitelinas) e o ceco (ERASMUS, 1973, 1986; MACHADO-SILVA et al., 2008; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

Figura 1 - Morfologia das diferentes fases evolutivas, ovo, miracidio, cercaria e verme adulto (maho e femea).

Fontes: http://www.biologia.seed.pr.gov.br;http://www.cdipd.org; http://scan.myspecies.info; http://www.biologia.seed.pr.gov.br.

2.2 Esquistossomose

A esquistossomose ou bilharziose é uma doença de veiculação hídrica, amplamente relacionada com a falta do saneamento básico e condição socioeconômica, ambiental, sendo classificada pela organização mundial de saúde como uma doença negligenciada. É uma infecção parasitária, considerada endêmica em zonas rurais ou em municípios com baixo poder aquisitivo, essencialmente em países em desenvolvimento (CANTANHEDE et al., 2010; SILVA, 2011; SILVA et al., 2012; PINTO, 2013). Esta patologia tem como principais agentes etiológicos para o homem, as espécies *S. mansoni, S. haematobium, S. japonicum, S. Intercalatum, S. mekongi e S. malayensis*. (CHITSULO et al., 2000; BROOKER, CLEMENTS, BUNDY, 2006; GRYSEELS et al., 2006; CANTANHEDE et al., 2010; MORAES, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 261 milhões de indivíduos estejam infectados e outras 659 milhões vivam em áreas de risco de infecção (OMS, 2018; SILVA et al., 2019). A doença é encontrada em 78 países entre a Ásia, África, América Central e do Sul e Oriente Médio (RASO et al., 2007; UTZINGER et al.,

2009; AIRES et al., 2014). Na América Sul, a doença é distribuída em região do Caribe, Venezuela e Brasil, na África e Mediterrâneo incluem a região do Delta do Nilo entre outros países, como Egito e Sudão (MS, 2008; SILVA et al., 2011; MARTINS et al., 2014). Foram reportadas que em 2016 cerca de 219,9 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo para esquistossomose e destas, 89 milhões de pessoas foram informadas e tratadas. Outro estudo realizado em 2017 mostra que 98,7 milhões de pessoas conseguiram o tratamento preventivo em mais de 50 países, onde o índice da transmissão é reportado como moderado a alto (WHO, 2018; MENDES, 2019).

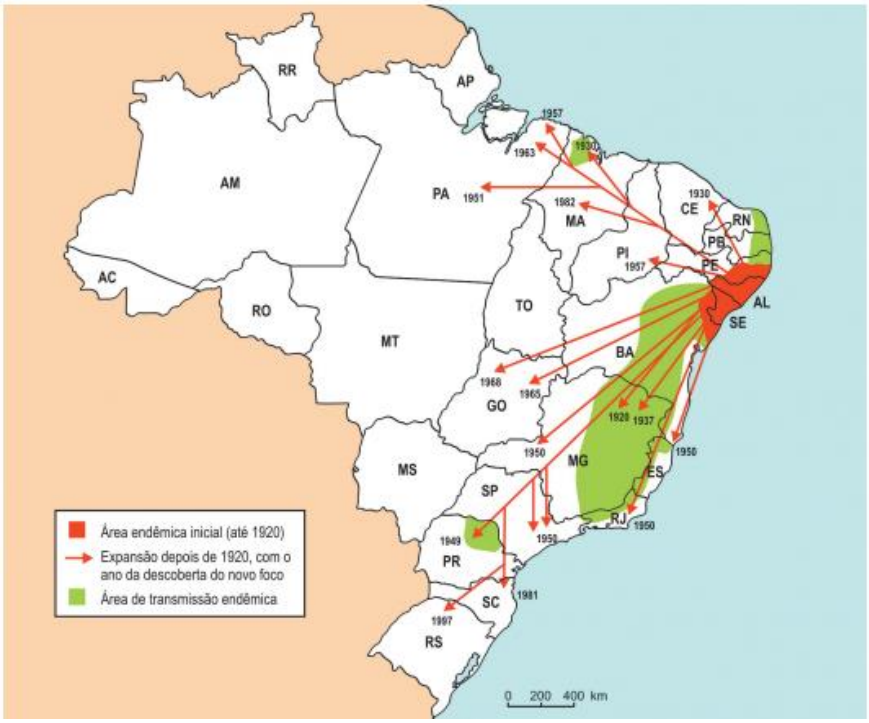
A Organização Mundial de Saúde considerou a esquistossomose como a terceira doença parasitária de alta frequência no mundo, e a segunda maior doença tropical, ficando atrás apenas da malária (FERREIRA et al., 1998; RAGHAVAN, 2003; LOPES et al., 2011). De acordo com a estatística da OMS (2010), em 2008 nas América, cerca de 7,1 milhões de indivíduos estavam infectados pela doença, destes 95% encontram-se no território brasileiro.

Vários relatos na literatura apontaram que a esquistossomose chegou ao Brasil no período colonial trazidos pelos africanos escravizados, infectados pelo *S. mansoni*, sendo detectado e descrito pela primeira vez pelo médico Augusto Pirajá da Silva, no estado da Bahia (KATZ, 2003). A expansão e a permanência da doença foram facilitadas pela migração de pessoas infectadas, devido ao desenvolvimento de novas atividades econômicas e a produção industrial, relacionada ao intenso processo de urbanização, precárias condições socioeconômicas, as dificuldades de acesso aos serviços da saúde, as más condições de tratamento da água e esgoto e a falta de educação e saúde, e além da dispersão dos moluscos vetores (COIMBRA JUNIOR, 1984, 1994; KATZ, 2000; ARAUJO, 2004; MORAES et al., 2014).

No Brasil a esquistossomose mansônica é considerada como importante problema para a saúde pública. Em 1907 no estado da Bahia, ~~Brasil,~~ a esquistossomose mansônica, como já mencionado, foi descoberta pela primeira vez pelo Pirajá da Silva (AMARAL et al., 2006; MORAES, 2011; FAVRE et al., 2015; NEVES, 2016). Conhecida popularmente, no Brasil por xistossomose, xistosa, moléstia de Pirajá da Silva, doença dos caramujos ou barriga-d'água; sendo esta última expressão escolhida por causa da ascite que se desenvolve no individuo infectado (KATZ; PEIXOTO, 2000; AMARAL et al., 2006; MORAES, 2011; NERES et al., 2011; REY, 2011).

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária/MS (2008) dos 27 estados brasileiros, a transmissão da esquistossomose ocorre em 19 unidades federativas: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande de Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto os estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande de Sul, Goiás e Distrito Federal, são consideradas áreas focais com menor número de prevalência (**Figura 2**) (MARTINS-MELO et al., 2014). As regiões litorâneas são consideradas áreas de maior ocorrência da esquistossomose, abrangem desde a região norte até o Sul, sendo endêmica em vários estados da região Nordeste e Sudeste (ARAUJO, 2004; KATZ, 2018).

Figura 2 - Locais de prevalencia da Esquistossomose no Brasil.



Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia esquistossome mansoni diretrizes tecnicas.pdf

Os estados do Nordeste são marcadamente endêmicos, e Pernambuco destaca-se como o de maior prevalência. Historicamente, a esquistossomose neste estado é caracterizada como uma endemia rural. Dos 186 municípios do estado 102 são considerados endêmicos, e localizam-se predominantemente na Zona da Mata e Litoral. Os municípios como Una, Sirinhaém, Ipojuca, Jaboatão e Goiana são consideradas municípios com alta prevalência da esquistossomose. Das 242,419 pessoas examinadas em 2015 a prevalência média foi de 3,0% e o número de óbito foi de 181 pessoas durante o período de 2005 a 2014. Pernambuco apresentou a maior taxa de mortalidade nesse

mesmo período, ao comparar com a média nacional de outros estados do Nordeste (PERNAMBUCO, 2015; COSTA et al., 2017). Desde 1992, a propagação da esquistossomose vem sendo registrada nas áreas litorâneas do estado, os casos agudo da doença em pessoas da classe média/alta tem sido detectado (GONÇALVES et al., 1992; BARBOSA et al., 2015). Os criadouros dos moluscos nas áreas litorâneas podem ser encontrados, principalmente ao redor das residências e no período chuvoso estes criadouros transbordam causando aumento na infecção humana (PAREDES et al., 2010; BARBOSA et al., 2010, 2011; NETO et al., 2013).

2.3 Ciclo da esquistossomose

A biologia de *S. mansoni* é bastante interessante, transita por diferentes fases evolutivas e habita em hospedeiros de formas distintas, além de possuírem ampla capacidade de aclimatação, reprodução e resistência. As fases evolutivas do ciclo biológico de *S. mansoni* contêm duas etapas da vida parasitária, uma que inicia no hospedeiro intermediário e outra no hospedeiro definitivo. Durante o ciclo evolutivo, as fases de miracídios e da cercária possuem vidas livres em ambiente aquático (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004; GRYSEELS et al., 2006; MORAES, 2011, NEVES, 2016). Geralmente, o ciclo assexuado de *S. mansoni* é efetuado nos moluscos das espécies *B. glabrata, B. straminea, B. tenagofila* (INOBAYA et al., 2014; BARBOSA et al., 2012). A compatibilidade dos hospedeiros intermediários a diferentes linhagens do parasito e a sua distribuição geográfica contribui para alta prevalência da esquistossomose (HAGAN, GRYSEELS, 1994; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

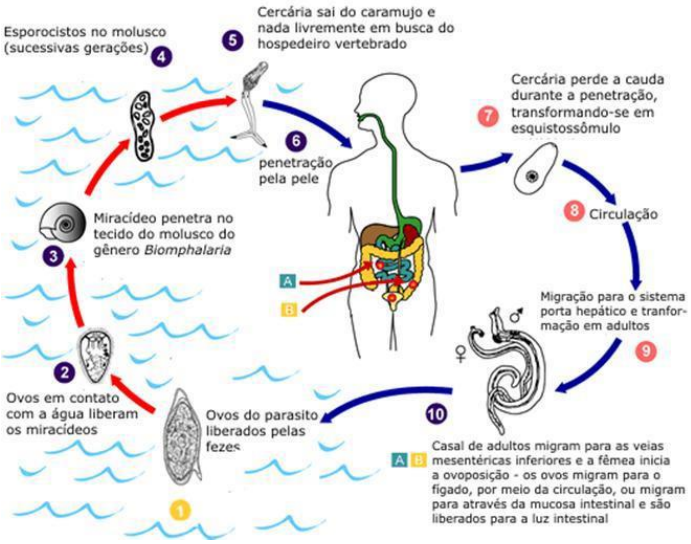
Os pares dos vermes adultos de *S. mansoni* albergam-se em vênulas terminais do plexo mesentérico inferior que drenam a parede intestinal. Em torno de 300 a 400 ovos, são depositados pelas fêmeas dentro das vênulas. De acordo com o padrão experimental, avalia-se que cerca da metade a um terço desses ovos chegam ao ambiente externo por meio das fezes. A deposição dos ovos pelas fêmeas no hospedeiro ocasiona a inflamação e pode gerar uma abertura da parede da vênula liberando os ovos nos tecidos perivasculares, que em seguida chegam à luz intestinal. Os vermes de *S. mansoni* têm uma vida média de cinco anos, porém há relatos que em alguns casais conseguiram viver mais de 30 anos eliminando ovos. Os ovos eliminados podem durar uma semana até a sua completa maturação, o miracídio formado (ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

Portanto, o ciclo começa, com a eliminação das fezes, juntamente com ovos do parasito pelo indivíduo infectado, em local com água parada e pouco poluída (Figura 3).

Os ovos que conseguem alcançar ambiente externo, possuem uma vida média de 24 horas em fezes líquidas e 5 dias em fezes sólidas. No momento em que os ovos, alcançam a água e ocorre à eclosão, liberam os miracídios, que são o aspecto larval do parasito que penetram no molusco vetor, em torno de 8 horas, com a influência da temperatura. O desenvolvimento para sua forma larval depende da temperatura, intensidade da luz e da oxigenação. Após 3 a 5 dias transformam-se em cercárias no corpo do molusco, ou seja, dentro do molusco os helmintos se reproduzem assexuadamente, originando as cercárias. Após 30 dias as cercárias são liberadas na água e nadam a procura do seu hospedeiro definitivo (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004; MS, 2005; GRYSEELS et al., 2006; BARBOZA et al., 2012; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

As cercarias entram em contato com hospedeiro definitivo através da pele; ao penetrar, elas perdem a cauda tornando-se esquistossômulo. Atingindo a circulação sistêmica, os helmintos jovens transitam por meio de pulmões e do fígado. Em torno de 5 semanas depois da infecção, estando albergados nas veias mesentéricas, os helmintos alcançam a maturidade sexual e as fêmeas começam a ovoposição. Após 40 dias da penetração das cercárias, os ovos começam a surgir nas fezes. De um modo geral, no hospedeiro definitivo o helminto se transforma de cercaria para esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, verme imaturo, e verme adulto macho ou fêmea (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004; GRYSEELS et al., 2006; MORAES, 2011; NEVES, 2016).

Figura 3 - Ciclo biologico da Esqustossomose.



Fonte: Rafael Mendes - CPqAM/FIOCRUZ

2.4 Aspectos Clínicos da esquistossomose

Na maioria das pessoas, que habitam áreas de maior endemismo, a infecção ocorre na infância e em muitos casos passa de forma despercebida sem diagnóstico, devido a ausência de sintomas. A infecção por *S. mansoni* pode ocasionar manifestações clinicas distintas que irão depender da idade do paciente, estado nutricional, localização do parasito, intensidade do parasitismo, o tipo de linhagem do parasito, resposta imune à infecção, além da reação do organismo do paciente a presença do ovo de *Schistosoma* (REY, 1991; KATZ; ALMEIDA, 2003; CARVALHO et al., 2008; CASTRO, 2009).

A esquistossomose pode ser classificada em fase aguda ou crônica, sendo que a fase aguda se divide em duas fases distintas: fase pré-postural e pós-postural. A fase pré-postural inicia-se com a penetração da cercária através da pele do hospedeiro definitivo, isso geralmente, acontece de 10 a 35 dias após a infecção e pode apresentar diversos sintomas clínicos como dermatite cercariana acompanhada de coceira e vermelhão, além de mal-estar com ou sem febre; ainda pode exibir sintomas, como febre, sudorese, cefaleia, dores musculares, cansaço, inapetência, emagrecimento, tosse, dor abdominal e um quadro de hepatite aguada (RASO; NEVES, 1965; CASTRO, 2009; NEVES, 2016). No entanto, alguns indivíduos durante esta fase podem ser assintomáticos, isto vai depender da carga parasitária, características dos pacientes e outros fatores citados anteriormente. A fase pós-postural começa com a postura do ovo no sistema porta-hepático, após a mobilização e maturação dos vermes. Os sintomas dessa fase incluem mal-estar, febre alta, náusea, cefaleia, anorexia, calafrios, tosse, sudorese, fenômeno

alérgico, diarreia, disenteria, cólica, emagrecimento, eosinofilia, leucocitose, hepatoesplenomegalia discreta e modificações discretas das funções hepáticas (CASTRO, 2009; NEVES, 2016). A fase aguda se desenvolve para a fase crônica em um intervalo de 4 a 6 meses (NEVES, 2016).

A fase crônica pode ser caracterizada pelas quatro formas clínicas: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica compensada e hepatoesplênica descompensada. O sintoma mais frequente na forma intestinal é a diarreia, dor abdominal, inapetência e cansaço. A forma hepatointestinal apresenta sintomas semelhantes, as da forma intestinal, porém os sintomas se encontram mais acentuados. Nesta fase o fígado e o baço também apresentam volume aumentado denominada hepatoesplenomegalia. A forma hepatoesplênica confere a característica da doença, ou seja, é considerada a forma mais grave da esquistossomose mansônica (PORDEUS et al., 2008; CASTRO, 2009; NEVES, 2016).

O fígado aumenta devido à reação inflamatória granulomatosa, ocasionada pela mobilização de ovos do parasito nesse órgão (WARREN, 1972; NEVES, 2016). A manifestação clínica da esquistossomose hepatoesplênica pode ser classificada em compensada e descompensada. A forma compensada exibe as manifestações, como hepatoesplenomegalia e fibrose hepática. Os indivíduos com a forma descompensada podem exibir hipertensão portal, desenvolvimento de circulação colateral, hematêmese, ascite, varizes do estomago, anemia acentuada, desnutrição e quadro de hiperesplenismo (BARBOSA; GOMES, 2008; NEVES, 2016).

2.5 Hospedeiros Intermediários

Como foi citada anteriormente a esquistossomose é uma helmintíase humana que utiliza o molusco do gênero *Biomphalaria, Bulinus e Oncomelania*, como hospedeiro intermediário. (GRYSEELS et al., 2006; RASO et al., 2007; OMS, 2013, 2014;). Os gêneros *Oncomelania* e *Neutricula* são considerados hospedeiros intermediários da esquistossomose intestinal na Ásia para dois tipos de trematódeo, *S. japanicum* e *S. mekongi*, respectivamente. O gênero *S. Intercalatum possui* como hospedeiro intermediário o gênero *Bulinus,* conhecido como causador da esquistossomose intestinal na África (BRASIL, 2008; MUNIZ 2007; SERAPIÃO et al, 2009; NALUGWA et al, 2010).

Na América latina, especialmente no Brasil, com maior endemicidade, o gênero *Biomphalaria* é o vetor da transmissão. Existem 10 espécies e uma subespécie deste

gênero no território brasileiro, entre os quais somente três espécies são hospedeiros naturais do trematódeo *S. mansoni*: *B. glabrata* (SAY, 1818), *B. tenagophila* (ORBIGNY, 1835) e *B. straminea* (DUNKER, 1848), os restantes são considerados espécies não hospedeiras, *B. amazonia (*PARAENSE, 1966), *B. peregrina* (ORBIGNY, 1835) e como hospedeiros potenciais e *B. intermédia* (PARAENSE & DESLANDES, 1962), *B. kuhniana* (CLESSIN, 1883), *B. schrammi* (CROSSE, 1864), *B. oligoza* (PARAENSE, 1975), *B. occidentalis (*PARAENSE, 1981) e *B. tenagophila guaibensis (*PARAENSE, 1984) (MS, 2007; CORRÊA; PARAENSE, 1971; PARAENSE; CORRÊA, 1973; NEVES, 2016). Os moluscos, hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil, fazem parte do filo Molusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommomatophora, Família Planorbidae e Genero *Biomphalaria* (NEVES, 2016). Na região Nordeste, os moluscos hospedeiros intermediários amplamente encontrados são *B. glabrata* e *B. straminea* (BARBOSA; GOMES, 2008; BARBOZA et al., 2012).

A espécie *B. glabrata* (Figura 4) é amplamente encontrada ao longo da faixa costeira do Nordeste e em algumas regiões do norte, sudeste, centro-oeste e sul do Brasil. São espécimes hermafroditas, ou seja, capazes de se autofecundarem, vegetarianas, habitam coleções de água doce com ótima insolação, temperatura média da água em torno de 20e 26 °C, pH entre 6 a 8, salinidade de 3/1000, preferencialmente em águas paradas e rasas, pouco poluídas como lagoas, lagos, poças, remansos de rio, riachos, canais de irrigação, plantação de arroz ou, em qualquer local alagado. (BARBOSA; GOMES, 2008; ALMEIDA, 2010; NEVES, 2016). Além dessas áreas, também possuem a capacidade de sobreviver em regiões, onde ocorrem secas sazonais, produzindo mecanismos de resistência à dessecação, ou seja, os moluscos permanecem em estado de estivação e ainda podem hospedar formas imaturas de *S. mansoni*. Quando as condições ambientais voltam a ser propícias, os moluscos saem do estado de estivação e se multiplicam rapidamente repovoando o criadouro, um único espécime é capaz de gerar mais de 10 milhões de descendentes. No Brasil, o *B. glabrata* é considerado o hospedeiro mais eficaz, devido a sua compatibilidade para diferentes linhagens do parasito, contribuindo pelo aumento de infecção do molusco, dando mais sobrevida e liberando mais cercárias (BARBOSA; GOMES, 2008; NEVES, 2016).

O molusco *B. glabrata* adulto chega a medir de 20 e 40 mm de diâmetro, com a largura de 5 e 8 mm, podendo conter de seis a sete giros, exibem prepúcio alongado com numerosos ventrículos e ramificações, vagina igual a uma bolsa bem definida

(denominada bolsa vaginal) e dilatações nas laterais (BARBOSA; GOMES, 2008; NEVES, 2016). Além disso, os moluscos apresentam uma crista renal, que confere característica taxonômica exclusiva do hospedeiro (PARAENSE; DESLANDES, 1955; NEVES, 2016). Segundo Barbosa e Gomes (2008), a espécie *B. glabrata* também pode se reproduzir por fecundação cruzada, quando encontrados em grupos. Geralmente, ovipõem massas ovígeras (desovas), a noite, principalmente em suportes sólidos. As desovas são cobertas por uma membrana gelatinosa, que recebe o nome de cápsula ovígera. O desenvolvimento embrionário ocorre durante o período de 7 a 9 dias, passando por diferentes fases larvais. (KAWANO, 1992, NEVES, 2016).

Portanto uma das estratégias de combate a esquistossomose ocorre por meio da eliminação do molusco *B. glabrata*. Atualmente são utilizados moluscicidas químicos, que apresentam eficácia na eliminação ou redução das formas adultas e embrionárias dos moluscos, porém com baixa especificidade, danificando a fauna e flora do local de aplicação (MCCULLOUGH et al., 1980; CANTANHEDE et al, 2010). Sendo assim, vários produtos químicos originários de vegetais têm sido estudados no sentido de descobrir substâncias que visam combater os moluscos vetores da esquistossomose sem causar tantos efeitos danosos ao ambiente aquático (MCCULLOUGH et al., 1980*;* MARSTON; HOSTETTMAN, 1985; CLARCK et al.,1994; NASCIMENTO, 2006; CANTANHEDE et al, 2010; SILVA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2019)

Figura 4 - Foto do molusco da especie *Biomphalaria glabrata* Say, 1818

Fonte: www.xenophora.org

3 HISTÓRICO SOBRE ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE

As principais estratégias utilizadas, nos programas nacionais e internacionais de controle à esquistossomose são: tratamento de pessoas infectadas pelo uso de quimioterapia em massa, por meio do Praziquantel (PZQ); eliminação de moluscos hospedeiros intermediários pelo controle químico; prevenção de contaminação humana, educação e comunicação, saneamento básico e higiene (TLAMÇANI; ER- RAMI, 2014).

O método utilizado para eliminação ou redução dos moluscos hospedeiros intermediários têm recebido mais atenção em todo mundo pelos programas de controle á esquistossomose. No entanto, os programas de controle a essa patologia, ainda continuam a dar mais atenção ao uso de quimioterapia em massa, utilizando Praziquantel (PZQ) para reduzir o número de pessoas infectadas em todas as regiões endêmicas (OMS, 2006; GURARIE et al, 2015).

No Brasil, em 1975 foi elaborado o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE). Esse programa foi implantado e fez parte da principal estratégia da campanha da Superintendência de Campanha da Saúde Pública (SUCAM), que visava controlar a esquistossomose em todas as regiões endêmicas do país. Para execução do programa foram tomadas as seguintes medidas: realização de inquérito coproscópico e malacológico, feita para definir o perfil epidemiológico da doença (BARBOSA; GOMES, 2008; ROLLEMBERG et al, 2011; NEVES, 2016).

Para medidas de tratamento dos doentes e controle da doença foi utilizado tratamento quimioterápico em grande parte da população. Para o controle dos moluscos vetores foi usado a Niclosamida, moluscicida sintético, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Medidas de saneamento básico e educação em saúde, além da vigilância epidemiológica e tratamento das novas incidências, foram medidas adotadas por este programa. Como resultados foram observados que mais de 12 milhões de tratamentos foram realizados, constatando-se redução de número de portadores das formas graves e da taxa de mortalidade. Porém, foram encontradas dificuldade no processo seletivo para o tratamento dos doentes e também ocorreram muitos danos ambientais, relacionado à utilização da Niclosamida, durante esta campanha da SUCAM. (BARBOSA; GOMES, 2008; ROLLEMBERG et al, 2011).

Em 1980, o PECE passou a fazer parte do programa regular do Ministério da Saúde. Com isso, o programa ganhou outra denominação, chamada de Programa de Controle da

Esquistossomose - PCE (BARBOSA; GOMES, 2008; NEVES, 2016). Os princípios do programa foram mantidos bem como a norma geral recomendada foi à realização do inquérito coproscópico em crianças na idade escolar, 7 a 14 (AMARAL; PORTO, 1994). Com essa mudança, o PCE direcionou suas ações de controle à quimioterapia em massa, estimulando outros órgãos da saúde pública a participar no diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, tais como, Fundação Serviço Especial de Saúde Pública - FSESP, Instituto Nacional de Assistência Médica e Previdência Social - INAMPS e Secretária Estadual de Saúde (CASTRO, 2009). Ambos os programas mostraram quedas na prevalência dessa endemia. No final da década de 90 o PCE começou a mostrar um impacto negativo na prevalência, devido às irregularidades encontradas no plano sistemático de tratamento quimioterápico da população alvo (FAVRE et al, 2001; BARBOSA; GOMES, 2008).

Com essas irregularidades do PCE, foi elaborado em 1996 o Programa de Sistema de Controle da Esquistossomose - SISPCE com o propósito de controlar as atividades desenvolvidas pelo PCE. O sistema forneceu informações relacionadas às ações do PCE, em todos os municípios, além da utilização dos bancos de dados que ajuda a avaliar as situações epidemiológicas desses municípios. Entretanto, o sistema gerou os seguintes dados: número de exames realizados, percentagens de positividade, carga parasitária, número de pessoas em tratamento e os que já estão tratados, quantidades e espécies de moluscos capturados. Esses dados gerados através do sistema foram fundamentais na busca dos indicadores, com o propósito de monitorar a extensão da endemia e fornecer informações que ajudaram no planejamento das ações de controle dessa moléstia (FAVRE et al, 2001; BARBOSA; GOMES, 2008).

Antes da descentralização das ações do controle da esquistossomose, a coordenação estadual do PCE se responsabilizava da recolha de todos os dados enviados pelos municípios. Porém, com a descentralização do programa, entre 1999 e 2000, a responsabilidade passou a ser dos municípios. A capacitação dos municípios passou a ser de responsabilidade das equipes estaduais. Todos os dados recolhidos pelos municípios eram direcionados a Gerência Técnica da Esquistossomose da Secretária de Vigilância Sanitária - MS (MS, 2005; FARIAS et al, 2007; BARBOSA; GOMES, 2008).

Apesar da sua existência por mais de uma década, o SISPCE não conseguiu direcionar as ações do PCE, partindo dos indicadores fornecidos pelo sistema, que era um dos seus principais objetivos. Os estudos realizados por Farias et al, (2007), analisando

os dados relacionados ao Estado de Pernambuco, entre 1999 - 2003, evidenciaram que havia uma discrepância dos dados do sistema com os do SISPCE para o ano 2001, onde também foi constatado falhas na digitação. Segundo Barbosa e Gomes (2008), os problemas enfrentados pelo PCE ao longo dos anos são as consequências de falta de adaptação ao processo de descentralização da saúde em vários níveis do governo, submetendo as normas da VIII Conferência Nacional de Saúde em 1986. Esse fato foi o marco na história da Reforma Sanitária Brasileira. Em 1991, foi reconhecido com o lançamento da primeira Norma Operacional Básica (NOB), que prescreveu as diretrizes para a criação do Sistema Único de Saúde (SUS). Ainda segundo esses autores, o principal objetivo da descentralização foi transferir o poder público-administrativo concentrado no governo federal e estadual para os municípios, assegurando às necessidades da população na tomada de decisão do poder público.

O desenvolvimento das atenções básicas, conforme as proposições da Norma Operacional da Assistência à Saúde (NOAS, 2001) e com a presente divulgação de pacto pela saúde, em 2001, se deu a condição de colocar em dias as atividades do controle da esquistossomose nos municípios. Os municípios considerados endêmicos devem incorporar o Programa Pactuado Integral (PPI) como estratégia das ações da saúde a cumprir. Os PSFs com a presente política de atenção básica foram transformados, como estratégia para assegurar às atenções prestadas a população, sendo responsabilizados em desenvolverem as atividades do PCE, no que concerne o diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas (MS, 2006; BARBOSA; GOMES, 2008).

Nos últimos anos, vários programas de controle às endemias têm recebido financiamento para o combate as doenças negligenciadas. De acordo com programa de enfrentamento - SANAR, que é um programa lançado no segundo semestre de 2011 pela Secretária Estadual de Saúde do estado de Pernambuco, as doenças negligenciadas são causadas por diferentes agentes, sendo endêmicas em regiões com população mais empobrecida. Ainda possuem indicadores inacreditáveis, com investimento muito precário para pesquisa de medicamentos (WERNECK et al, 2011; Secretaria Estadual de saúde- Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas do Estado de Pernambuco, 2013).

No Brasil, as doenças consideradas negligenciadas são: dengue, doença de chagas, esquistossomose, malária e tuberculose (Ministerio da Saúde, 2010). As estatísticas da

OMS citado por MS (2010) e Virmond (2010) estima que mais de um milhão de pessoas estão infectadas com mais de uma doença negligenciada.

Em 2006, foi realizada a primeira oficina de prioridade em doenças negligenciadas e o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em doenças negligenciadas no Brasil, em parceria com MS e Ministério de Ciência e Tecnologia (MS, 2010). Em 2008 foi realizada uma nova oficina, que visou o lançamento do edital temático na área, a Secretária de Vigilância em saúde do MS, também faz parte da parceria do programa, dando a sua contribuição no que concernem as definições das prioridades na área e para avaliação dos resultados das pesquisas financiadas (MS, 2010).

A Secretária Estadual de Saúde do estado de Pernambuco lançou em 2011 um programa específico de enfrentamento às doenças negligenciadas que tinha como objetivo reduzir ou eliminar as essas doenças até 2014. O programa SANAR foi lançado no primeiro semestre de 2011 com a proposta de implementar atividades de controle as doenças em 108 municípios prioritários. Entre todos os estados brasileiros, Pernambuco foi o primeiro estado a estabelecer um programa específico contra essas doenças. Para Vigilância Epidemiológica foram investidos R$ 5,6 milhões para fortalecer e capacitar às equipes de atenção básica à saúde, que ajudaram na identificação e manejo clínico adequado, ampliação de diagnóstico e a melhoria do acesso a tratamento e medicamento (Secretaria Estadual de saúde- Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas do Estado de Pernambuco, 2013).

Dentre as doenças que fizeram parte do programa de enfrentamento estadual destacamos: tracoma, doença de chagas, hanseníase, filariose, esquistossomose, helmintíase e tuberculose. Atualmente esse combate está sendo realizado pela Secretária Estadual de Saúde (SES) em colaboração com os municípios, secretária de saúde e educação, Ministério de Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), OMS e entre outras parcerias (Secretaria Estadual de Saúde - Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas do Estado de Pernambuco, 2013)

4 ESQUISTOSSOMICIDAS E MOLUSCICIDAS

Os métodos profiláticos baseados no fornecimento de água potável, as implantações dos sanitários e direcionamento correto dos esgotos têm sido considerados os melhores métodos para o controle e combate a esquistossomose em médio e longo prazo. Porém, aplicações dessas medidas estão longe de ser uma realidade em áreas endêmicas, pois os recursos financeiros são insuficientes (BERQUIST, 2002;

BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2006; FENWICK et al., 2006; STEINMANN et al., 2006; KING, 2009; MORAES, 2011; TLAMÇANI; ER- RAMI, 2014; NEVES, 2016; MENDES, 2019).

A quimioterapia em massa em comparação aos outros meios de controle, continua sendo o método mais eficaz no combate dessa enfermidade. Por outro lado, a literatura mostra que, a terapêutica da esquistossomose ainda apresenta limitações pela dificuldade de descoberta de novas drogas mais eficazes no combate dessa patologia (FENWICK et al., 2003; HOTEZ et al., 2010; ZHANG et al., 2010; MORAES, 2011). Historicamente, o tratamento quimioterápico em larga escala começou desde 1910, onde foi aplicada na clínica o tártaro de emético (tartarato de antimônio e potássio). Posteriormente, vários outros quimioterápicos como sais de antimônio foram incluídos para serem aplicada na clínica por via intramuscular ou intravenosa, entre os quais podem ser citados: dissulfanato-bis-pirocatecol de sódio e antimônio (Stibofen), gluconato de antimônio e sódio (Tiostam) e tiomolato de antimônio e sódio (Anthiomaline). Segundo os relatos encontrados na literatura especializada, os quimioterápicos provenientes de sais de antimônio foram utilizados durante 50 anos para o tratamento da esquistossomose. Embora essas drogas apresentassem ação sobre as três espécies do gênero *Schistosoma*, envolvidas na transmissão da doença, passaram a não ser mais usadas no controle desses parasitos, por apresentar diversos efeitos colaterais como toxicidade, modificações nas células sanguíneas, e até mesmo morte súbita (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; CIOLI, 1998; MORAES, 2011).

A evolução do tratamento quimioterápico se iniciou na década de 60, quando foram empregados alguns medicamentos antiparasitários como o niridazol, hicantona, oxamniquina e metrifonato. Posteriormente na década de 70 foram descobertos outros quimioterápicos tais como amoscanato, oltipraz e Praziquantel, sendo este último o mais relevante até os dias atuais (ANDRADE et al., 1974; KATZ, 1977; CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; CIOLI, 1998; PARISE FILHO; SILVEIRA, 2001; MORAES, 2011; PADILHA, 2013, COSTA, 2018).

Portanto, no momento atual, o medicamento preconizado na clínica assim como em campanhas de controle e combate a esquistossomose é o Praziquantel (PZQ) que é o nome genérico para 2-(ciclohexilcarbonil)- 1,2,3,6,7,11b-hexahidro 4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin- 4-ona. As pastilhas de PZQ comercializadas são normalmente alongadas, contendo 600 mg do ingrediente ativo, além de possuir um sabor amargo. Sabe-se que o

mecanismo molecular de ação do PZQ atua desestabilizando a homeostase do Ca^{2+} e a função neuromuscular do verme através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (GREENBERG, 2005), causando um comprometimento da estrutura e função do tegumento, espasmo e paralisia dos músculos subjacentes, culminando na eventual morte do parasita (LORSUWANNARAT et al. 2013).

Embora eficaz contra vermes adultos, e considerado biosseguro e de baixo custo (BERTÃO et al. 2012), o PZQ, nas doses recomendadas, não apresenta eficácia terapêutica contra vermes jovens (3 a 4 semanas de desenvolvimento após a infecção), além de não prevenir a reinfecção. Sua formulação atual, na forma de racemato, contribui para o grande tamanho do comprimido e seu sabor amargo, o que dificulta a adesão ao tratamento, principalmente em crianças (GOUVEIA et al., 2018). Além disso, devido a sua utilização massiva em regiões endêmicas para controlar a infecção, alguns relatos, tem surgidos na comunidade médica, sobre resistência de cepas de *Schistosoma* ao Praziquantel (BOTROS; BENNETT, 2007; WANG; WANG; LIANG, 2012; VALE et al. 2017).

Portanto, torna-se importante as pesquisas por novas drogas para efetivamente combater a esquistossomose, doença em expansão e que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo. Diante deste cenário, as plantas medicinais podem representar uma alternativa na aplicação de seus compostos ativos como drogas esquistossomicidas. No começo dos anos de 1980, os estudos revelam o uso da artemisina, uma lactona extraída das folhas de *Arthemisia annua*, e seus derivados como droga esquistossomicida. Na China essa droga foi aplicada sobre as espécies *Schistosoma* comprovando sua ação esquistossomicida principalmente sobre vermes jovens. O arteméter é um excelente agente antimalárico que tem apresentado ação contra os vermes jovens e tem sido usada de forma restrita em locais considerados endêmicos, para não ocasionar o surgimento de resistência nos agentes etiológicos da malária (BOUT; DESLÉE; CAPRON, 1984, 1986; CHAMPELL et al., 1987; CIOLI, 1998; XIAO et al., 2002; UTZINGER et al., 2001, 2003; CHIPPAUX et al., 2003; FENWICK et al., 2003; KEISER et al., 2009; MORAES, 2011).

Nos países africanos e asiáticos, relatos na literatura mostram que há vários indícios da eficácia dos extratos de diferentes partes da planta e de seus frutos preparados por curandeiros sobre os vermes, o que simboliza a sabedoria empírica e cultural da população em várias regiões do mundo. Por esta razão, a fitoterapia vem sendo

considerada como um recurso alternativo e potencial para o combate as parasitoses. Porém, ainda há poucos estudos sobre os compostos responsáveis pela atividade esquistossomicida e seus mecanismos de ação, ou seja, é preciso estudos mais detalhados para comprovar os benefícios da utilização de plantas na terapêutica das doenças parasitárias (NDAMBA et al., 1994; CLARK; APLLETON; KVALSVIG, 1997; SPARG et al., 2000; MOLGAARD et al., 2001; MORAES, 2011).

Moluscicidas são substâncias usadas para eliminação ou redução de moluscos encontrados em jardins, lavouras, estufas, campos e principalmente para controle e combate dos moluscos vetores de patologias (OMS, 1991; LEYTON et al., 2005; CANTANHEDE et al, 2010).

No controle e combate a esquistossomose vários métodos foram empregados para eliminar ou reduzir a população de moluscos *B. glabrata*, dentre os quais incluem o uso de moluscicida químicos (carbonato cúprico, niclosamida) e agentes biológicos (*Thiara granifera, Marisa carnuarietus e Helisomaduryi*) no controle ambiental dos moluscos (BARBOSA; GOMES, 2008).

De acordo com a organização mundial de saúde os moluscicidas são classificados em moluscicidas sintéticos e naturais (CANTANHEDE et al, 2010; OMS, 1991). Os moluscicidas sintéticos são substâncias químicas, incluídas no programa de controle dos moluscos vetores para erradicação da esquistossomose, testados em larga escala. Dentre os mais de sete mil produtos químicos testados podemos destacar o sulfato de cobre, Frescon, Gramaxone, hidróxido de cálcio, N- tritilmorfolina e a Niclosamida (REY, 2001; 2011; CANTANHEDE et al, 2010; NEVES, 2005; 2016). Esta última substância, Niclosamida, é a única preconizada pela OMS e comercialmente disponível como moluscicida sintético.

A Niclosamida apresenta uma toxicidade muito alta, na concentração de 1 mg/L, isto é, em oito horas elimina 100% dos moluscos adultos *B. glabrata* e *Bulinus* (CANTANHEDE et al, 2010; SELVA, 2010; NASCIMENTO, 2006; REY, 2001), no entanto, apresenta baixa seletividade, custo elevado, dificultando sua chegada em locais distantes, principalmente áreas rurais ou países em desenvolvimento, onde o foco é maior. Relatos encontrados na literatura confirmam que algumas espécies de caramujos desenvolveram mecanismo de resistência a essa substância (MCCLLOUGH et al, 1980; MARSTON; HOSTETTMANN, 1985 CANTANHEDE et al, 2010).

No Brasil, o único moluscicida utilizado no programa de controle a essa endemia é o Niclosamida, mas devido aos prejuízos ecológicos causados, atualmente o seu uso é recomendado somente em casos de extrema emergência. As desvantagens ou prejuízos causados por moluscicidas sintéticos tem aumentado o interesse e impulsionando estudos direcionados aos moluscicidas de origem vegetal, facilmente biodegradável, fácil obtenção e com baixo custo (BARBOSA; GOMES, 2008).

Os primeiros estudos direcionados as substâncias de origem vegetal como moluscicidas aconteceram em 1930, com a planta nativa do deserto do Sudão, denominada *Balaniteae gyptiaca L*, sendo recomendado o plantio dessa planta, nos arredores de um grande foco de transmissão. Os seus frutos ao caírem na água inibiam a densidade populacional dos caramujos (ARCHIBALD, 1933).

As primeiras pesquisas realizadas no Brasil sobre moluscicidas de origem vegetal foram com o extrato do caule de *Serjania spp* (cipó-timbó) e de *Sapindus saponaria L*. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão), que demonstraram atividades frente ao molusco *B. glabrata* (PINTO e ALMEIDA, 1994; NEVES, 2016). Logo, vários pesquisadores começaram a direcionar suas pesquisas em busca de moluscicidas naturais com as plantas regionais e muitos projetos estão sendo desenvolvidos em laboratórios de pesquisas com perspectivas futuras da sua utilização no campo. (MENDES, et al 1999; LEYTON, et al., 2005; BABILI, et al., 2006).

A atividade moluscicida da planta nativa da África do Sul, *Apoytes dimidiata*, apresentou a taxa de mortalidade de 50 a 90% em *Bulinus africanus* nas concentrações de 225 e 257 ppm. Os testes utilizados para avaliar a toxicidade aguda e subaguda em mamíferos, consideraram a planta tóxica e considera-se preliminarmente o extrato aquoso dessa planta viável e seguro para sua aplicação em campo (CLARK, 1994 e BRACKENBURY et al, 1997).

A avaliação do extrato aquoso das plantas chinesas, *Rheum palmatum e Rheum hupenis*, foram ativas, ou seja, apresentaram atividades moluscicida contra *B. glabrata*, *Oncomelania hupensis e Bulinus globosus* (LIU, *et al*, 1997). Foram testadas ações de 66 espécies de plantas contra os adultos da *B. glabrata,* somente seis espécies apresentaram atividades moluscicida: *Achyrochne satureoide* (Lam) D.C., *Actinoseris angustifólia* (Gardin) (Carbr), *Alonia myriadenia* Baker; *Piptocarpha rotundifolia* Baker; *Vanillosmopsis erithropappa* Sch. Bip. e *Verbesina clausseni* Sch. Bip. (MENDES et al., 1999).

Lopes e colaboradores, (2011) testaram atividade do extrato hidroalcoólico da folha de *Caryocar brasiliense* quanto ao seu potencial moluscicida. Observaram uma forte relação linear entre a concentração e a taxa de mortalidade, que alcançou a proporção de 100% na concentração de 0,17 mg/mL. Estes resultados demonstraram a presença de importantes metabólitos secundários nas folhas de *C. brasiliense* e o potencial desta planta para ser empregada como agente moluscicida.

Foram testados seis extratos brutos de Piperaceae em adultos e desovas de *B. glabrata*. Os extratos que apresentaram efeito tóxico em adultos foram *Peperomia trineura* a 100, 80 e 60 ppm e *Piper caldense* a 100, 80 e 50 ppm. Nas desovas os extratos que demonstraram efeito tóxico foram *P. trineura* a 100, 80, 60 e 50 ppm, *Peperomia rubricaulis* a 100 e 80 ppm e *Piper caldense* a 100 ppm apenas para os estádios de blástula, gástrula e trocófora. Este último extrato apresentou efeito tóxico a 80 ppm também para as fases de blástula e gástrula (TAKAHASHI et al 2010).

Em Pernambuco, alguns trabalhos realizados por Figueiredo (2008) mostrraram a atividade embriotóxica do extrato aquoso de folha da *Indigofera suffruticosa* sobre embriões de *B. glabrata,* nas concentrações de 5 e 10 mg/ml no período de 24 e 48 horas. Sousa (2009) testou o extrato da casca do caule do *Ziziphus joazeiro* sobre embriões da *B. glabrata,* e verificou que a concentração de 200 ppm apresentou maior toxicidade aos embriões da *B. glabrata.*

Sá, 2016, realizou experimento com extrato bruto de *Anadenanthera colubrina* (Angico) sobre moluscos adultos e embriões de *B. glabrata* e *A. salina* em diferentes concentrações por 24 horas; os moluscos expostos ao extrato de *A. colubrina,* nas concentrações de 125 e 250 ppm apresentaram frequência de mortalidade de 26,6 e 80%. Os caramujos expostos a concentração de 500 e 1000 ppm apresentaram 100% de mortalidade e, a DL_{50} estimada para moluscos adultos expostos ao extrato foi de 155,24 ppm. Para atividade embriotóxica, foram observados, que as concentrações de 125, 250 e 500 ppm não apresentaram alterações na viabilidade embrionária. No entanto, as concentrações de 600, 700 e 1000 ppm foram altamente tóxicas aos embriões de *B. glabrata* apresentando 46,7, 50,7 e 100% de inviabilidade, respectivamente. Foram utilizadas as concentrações de 125, 250, 500 e 100 ppm para o bioensaio com *A. salina,* a mesma utilizada no teste com moluscos adultos de *B. glabrata.* A DL_{50} estimada foi de 212,81 sendo a concentração de 125 ppm a menos tóxica ao meio ambiente.

Além dessas substâncias (sintéticas ou naturais), existe outro tipo de controle, denominado controle biológico, onde os caramujos competidores são introduzidos no mesmo ambiente com moluscos vetores. Os caramujos competidores amplamente estudados são: *Thiara granifera, Marisa carnuarietus e Helisoma duryi* (BARBOSA; GOMES, 2008). No entanto, este tipo de controle não é mais recomendado desde década de oitenta, devido ao risco de criar um desequilíbrio ecológico.

Portanto, a busca de novos compostos de origem natural para o controle da esquistossomose deve ser intensificada, principalmente utilizando os recursos naturais da nossa flora nordestina. Com este foco apresenta-se a aroeira de praia (*Schinus terebinthifolia* Raddi) como novo produto a ser testado como moluscicida, esquistosomicida e outras atividades biológicas que será abordada posteriormente.

5 CÂNCER E FITOFÁRMACOS

O câncer é um dos principais responsável pela morbidade e mortalidade das pessoas no mundo, se tornando assim, um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (TRAEBERT et al., 2013; CHINEMBIRI et al., 2014; INCA, 2015). Em 2015, mais de 8,8 milhões de pessoas morreram vítimas do câncer, considerado a segunda causa de morte no mundo todo (WHO, 2017). Relatos na literatura mostram que no ano de 2012 o projeto Globocan/Iarc indicou que, dos 14 milhões de novos casos, mais de 60% aconteceram em países subdesenvolvidos e dos 8 milhões de mortes, 70% aconteceram nesses países.

De acordo com os dados do projeto Globocan, em 2012, a ocorrência foi de 1,1 milhão de novos casos, na América Latina e no Caribe. Os tipos de câncer mais frequentes são o de próstata em torno de 152 mil casos para os homens e o câncer de mama para as mulheres, com mais de 15 mil casos. No entanto, até o momento o câncer cervical colabora de forma relevante pela quantidade de enfermidades em mulheres, representando como a segunda mais incidente e como segunda causa de morte por câncer em mulheres (INCA, 2015).

De acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2018, no Brasil, a estimativa feita para 2018-2019, indica cerca de 600 mil casos novos de câncer para cada ano. Excluindo o câncer de pele não melanoma com a incidência de aproximadamente 180 mil casos novos, ocorrerão em torno de 420 mil casos novos de câncer. Enquanto, o cálculo global corrigido para sub-registro, indica a incidência de 640 mil de casos novos. Portanto, segundo o INCA, 2018, os tipos de câncer que serão mais incidentes são

cânceres de próstata em homens, cerca de 68 mil e mama em mulheres, em torno 60 mil novos casos.

A palavra neoplasia deriva do termo grego que significa crescimento novo ("neo" = novo, "plasia" = formação) e é descrita como a ausência do equilíbrio entre o crescimento e morte celular que promove o surgimento da massa tumoral organizada ou desorganizada. O termo tumor é empregado, devido à tumefação da inflamação. A oncologia é a parte da ciência que estuda os tumores, portanto, classifica os tumores como benignos ou malignos (LIOTTA; KOHN, 2001; KUMAR et al., 2010; AMARAL, 2014).

A palavra câncer deriva do termo grego *carcinus*, que significa caranguejo. Portanto, o câncer é uma nomenclatura popular designado a centenas de enfermidades heterogêneas do genoma que provoca modificações importantes na fisiologia das células. Entretanto, podem ser destacadas as seguintes modificações: autossuficiência associada aos fatores de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; fuga à morte celular programada; potencial ilimitado de replicação; aumento da angiogênese; invasão tecidual e metástase (LUO, 2009; KUMMAR et al., 2010; YOU; JONES, 2012; MOURA, 2012; AMARAL, 2014).

O processo na qual o câncer se desenvolve é chamado de carcinogênese e consiste em um processo de várias fases bem definida como iniciação, promoção e progressão, normalmente ocorrem de forma lenta, associada à mutagênese, que podem durar muitos anos para ser detectada como massa tumoral (ALMEIDA, 2005; AMARAL, 2014).

A carcinogênese é um processo que transcende o obstáculo posto por pontos de regulação do ciclo celular, que asseguram a conservação da integridade do material genético (DNA), da célula de origem para célula filha. Esse processo ocorre devido à participação dos agentes carcinogênicos, que promove a modificação de uma célula saudável em célula tumoral, por meio de eventos mutagênicos e epigenéticos, em decorrência aos costumes ou hábitos sociais, alimentares e ocupacionais. Os agentes carcinogênicos são caracterizados como carcinógenos químicos (alquilantes, hidrocarbonetos policíclicos, benzopireno, aminas aromáticas e corantes azo), físicos (radiações ionizante e ultravioleta) e biológicos (*Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr (HBV), Papiloma vírus humano (HPV) e Herpesvírus humano 8 (HHV-8). É importante salientar que as mutações são estimuladas não só pelos agentes externos, mas também por erros de replicação do material genético (WROBLEWSKI; PEEK, 2013; ALIBEK; KAKPENOVA; BAIKEN, 2013; AMARAL, 2014).

Para o tratamento de câncer, a OMS preconiza uma avaliação cautelosa das opções fundamentadas nas evidências, que podem facilitar na escolha de mais de uma das formas terapêutica: cirurgia, radioterapia e terapia sistêmica (WHO, 2017). Outros estudos relatam que, o tratamento para o câncer pode ser aplicado por terapia sistêmica, como por exemplo, a quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo e imunoterapia, ou local como cirurgia, radioterapia e fototerapia (PALUMBO et al., 2013; RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013). De acordo com o INCA, a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, são formas utilizadas para o tratamento do câncer, além disso, em vários casos é indispensável à combinação de mais de uma forma de tratamento (INCA, 2017). Portanto, a preferência para um determinado tipo de tratamento dependerá da extensão e a intensidade da neoplasia. Evoluções desses tratamentos resultam na redução de mortalidade das pessoas com câncer em países desenvolvidos, mesmo com aumento da expectativa de vida (PALUMBO et al., 2013; RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013; AMARAL, 2014).

Estudos destacam que, na prática clínica a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia são as formas de tratamento mais escolhidas como recurso terapêutico para tumores malignos. Atualmente, outros recursos terapêuticos como a fitoterapia e a imunoterapia são frequentemente aplicados em associação com outros três métodos de tratamento acima citados para auxiliar no tratamento de câncer (KUSUZAKI et al., 2007; KATZUNG, 2010; AMARAL, 2014). Entretanto, estudos apontam que, o emprego de mais de uma forma de tratamento, vem fornecendo resultados satisfatórios a depender do tipo de câncer. Apesar desse avanço no campo da oncologia, muitas doenças cancerígenas ainda exibem respostas fracas e discretas (KUMMAR et al., 2004; AMARAL, 2014).

O método cirúrgico usado no tratamento de câncer se fundamenta na remoção do tumor promovendo a eliminação total, isto é, caso não haja metástase instalada. E com propósito de erradicar as células cancerígenas e micrometástases, o tratamento cirúrgico é acompanhado da quimioterapia (SAVAGE, 2007; MCLEOD, 2013; AMARAL, 2014). Por outro lado, tem sido estimulada a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento dos tumores sem possibilidades de tratar com métodos cirúrgicos, que afeta a qualidade de vida dos pacientes (GASPARINI; SARAIVA, 2004; AMARAL, 2014).

A radioterapia é usada pelo menos uma vez ao longo do tratamento em aproximadamente metade dos pacientes. De acordo com a literatura, após década de 60 tem sido utilizada como método indispensável para o controle e combate do câncer, principalmente com a criação de um acelerador linear. Porém, assim como o recurso

cirúrgico, não tem a capacidade de eliminar a metástase (CHABNER; ROBERTS, 2005; AMARAL, 2014). O tratamento com radioterapia é baseado na emissão de raio gama, radio isótopo e raios X, que ao em contato com células cancerígenas provoca danos no DNA dessas células, além disso, o tratamento com radioterapia também atinge as células saudáveis, levando assim, as limitações rigorosas desse método de tratamento. Esse método é frequentemente aplicado na etapa inicial do desenvolvimento do câncer em associação com cirurgia ou quimioterapia como o propósito de elevar a taxa de cura (FRANCESCHINI et al., 2007; KATZUNG, 2010; LOMAX et al., 2013; AMARAL, 2014).

Os agentes citotóxicos, ou melhor, a quimioterapia convencional tem sido aplicada desde 1940 e são considerados os primeiros métodos usados para o controle de câncer. Segundo a literatura, após os primeiros descobrimentos de agentes citotóxicos, vários outros agentes foram descobertos, isolados, caracterizados e posteriormente comercializados. Dentre vários agentes quimioterápicos citotóxicos podem ser citados os seguintes: agentes alquilantes (ciclofosfamida, temozolamida, cisplatina e oxiplatina), antimetabólicos (metotrexato, citarabina, fluorouracil e capecitabina), antibióticos antitumorais (doxorrubicina, epirubicina e bleomicina), inibidores da topoisomerase (etoposida e irinotecan) e estabilizadores de microtúbulos (paclitacel e docetacel) (PALUMBO et al., 2013; AMARAL, 2014). Entretanto, essas classes de agentes quimioterápicos possuem a capacidade de atuar em todas as fases da carcinogênese tais como iniciação, promoção e progressão. De acordo com relatos na literatura, os alcaloides da vinca, assim como taxanos e colcichina, são compostos antitumorais mais promissores de utilização na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer. Esses compostos agem como bloqueadores de microtúbulos celulares, comprometendo a atividade dos microtúbulos durante a divisão celular, causando a interrupção do ciclo e a morte celular por apoptose (BRADÃO et al., 2010; TOPHAM; TAYLOR, 2013; AMARAL, 2014).

Por outro lado, os relatos na literatura mostram que, agentes antineoplásicos utilizados atualmente, no tratamento de câncer possuem desvantagens como efeitos colaterais e adversos, apresentam toxicidades críticas e produção da resistência de muitos fármacos. Além, dessas desvantagens, esses agentes possuem altos custos além de serem ~~são~~ mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (NEWMAN et al., 2003; IYER et al., 2013; MARKMAN et al., 2013; CHINEMBIRI et al., 2014).

As desvantagens relacionadas ao tratamento convencional de doenças cancerígenas vêm aumentando o interesse dos pesquisadores a procura de novos

medicamentos alternativos e complementares para serem aplicadas no tratamento das doenças malignas (MOLASSIOTIS et al., 2005; CHINEMBIRI et al., 2014). Os compostos bioativos extraídos de plantas medicinais têm mostrado atividades promissoras como drogas antitumorais, bem como, podem auxiliar na síntese de novos medicamentos (CHINEMBIRI et al., 2014).

Os produtos naturais originários de plantas têm sido há muito tempo recursos tradicionais para novos medicamentos (LI; VEDERAS, 2007; MOLINSKI et al., 2009). O produto natural é um termo usado para se referir aos metabólitos secundários. Esses compostos, geralmente possuem baixo peso molecular e têm como função proteger e garantir a sobrevivência das espécies atraindo ou repelindo outros microrganismos (KINGHORN et al., 2009).

Os estudos com produtos naturais possuem dois aspectos diferentes a considerar: estudos da parte da planta a ser usado como medicamento ou de misturas complexa como extratos e chás. Segundo Suffredini e colaboradores (2006), essas pesquisas começam a partir de informações ~~a~~colhidas do conhecimento popular relacionadas ao uso tradicional de plantas para o tratamento de várias enfermidades ou a partir do relato de sua toxidade.

A morfina é considerada o primeiro composto puro, farmacologicamente ativo isolado a partir de planta *Papaver somniferum* e também é o primeiro disponível comercialmente em 1826 (LI; VEDERAS, 2007; JI et al., 2009). Essa descoberta abriu novas perspectivas, onde os medicamentos originários de plantas poderiam ser purificados, estudados e administrados doses determinadas independente da origem ou a idade do material (LI; VEDERAS, 2007).

Relatos na literatura apontam que, atualmente cerca de 60% dos medicamentos são originários de produtos naturais, tanto na sua forma natural, assim como análogos sinteticamente modificados (LI; VEDERAS, 2007; JI et al., 2009; KINGHORN et al., 2009).

Segundo Hartwel, 1982, as substâncias de origem natural são largamente aplicadas no controle e tratamento de neoplasia maligna e tem sido fontes essenciais dos compostos com propriedade antitumoral. Ferraz e colaboradores, 2005 relataram que no mundo existem ao menos 250.000 espécies de planta no mundo, destes, mais de 1000 plantas exibem potencial antitumoral. Outros estudos apontam que, mais de 60% dos medicamentos anticancerígenos aprovados desde 1983 até 1994 eram de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003; SILVA et al., 2009). Entre os quais podem ser destacados os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* G

Don. (Apocynaceae). Ademais, atividade do paclitaxel isolado da casca de *Taxus brevifilia* Nutt. (Taxaceae) sobre o câncer ovário, mama no estágio avançado e câncer de pulmão também representam avanços importantes na pesquisa de medicamentos de origem natural (ROWINSKY et al. 1992; NEWMAN, 2005). Outra substância de origem natural com potencial antitumoral é a epipodofililotoxina, isômero da podofilotoxina isolada das raízes das espécies do gênero *Podophyllum, Podophyllum peltatum e Podophyllum emodi* (Berberidaceae) (STAHELIN). Por outro lado, dois derivados semissintéticos da epipodofililotoxina são aplicados no tratamento de linfomas e câncer brônquico e testicular (HARVEY, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2005; SHOEB, 2006). Outro derivado de origem natural, aplicado na clínica para o tratamento de leucemia mieloide aguda e crônica, é um composto isolado de *Cephalotaxus harrintonia* (Cephalotaxaceae), denominada de homoharringtinuna (KANTARJIAN et al., 1996; CRAGG; NEWMAN, 2005; ITOKAWA; WANG; LEE, 2005). Sendo assim, é importante salientar que o uso de compostos de origem natural na indústria farmacêutica tem sido essencial na produção de novos modelos molecular que auxiliam no tratamento de neoplasias malignas (MOURA, 2012).

6 *SCHINUS TEREBINTHIFOLIA* (RADDI) - Aroeira da praia

Schinus terebinthifolia Raddi (Aroeira da praia) é uma planta nativa da América do sul, encontrada no Brasil, Paraguai e Argentina, havendo relatos da sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais da África e dos Estados Unidos. Entre as regiões do Brasil, *S. terebinthifolia* encontra-se distribuída, na região Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste, sendo amplamente encontrada entre Pernambuco ao Rio Grande do Sul (DVORKIN-CAMIEL, 2008; LORENZI, 2008; GUERRA et al., 2000; DEGASPARI et al., 2005; VIEIRA et al., 2015). (GILBERT; FAVORETO, 2011; CARVALHO et al., 2013 ESTEVÃO et al., 2015).

A classificação taxonômica da espécie *S. terebinthifolia* é: Reino Plantae; Subreino Tracheobionta; Subclasse Rosidae; Ordem Sapindales; Familia Anacardeaceae (USDA, 2017); sendo popularmente conhecido como aroeira de praia, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, aroeira pimenteira, aroeirinha e pimenta-rosa. (DEGASPARI et al., 2005; VIEIRA et al., 2015)

A família Anacardiaceae é constituída por mais de 600 espécies, disseminadas em mais de 70 gêneros, possuem a capacidade de se adaptar em vários meios, por isso, podem ser achadas em ambientes: secos e úmidos; países tropicais, subtropicais e temperados. Entre as espécies da família Anacardiaceae tipicamente comercializadas podem ser

incluídas as seguintes: *Mangifera indica* L. (manga), *Spondias tuberosa* L. (umbu), *Spondias mombin* L. (cajá), *Anacardium occidentale* L. (caju). Além do mais, alguns gêneros são ornamentais ou são usados tradicionalmente na medicina popular como, por exemplo, o gênero *Schinus* (SOUZA; LORENZI, 2012; GERHARDT, 2018). O gênero *Schinus* possui em torno de 30 espécies, disseminadas, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil a espécie *S. terebinthifolia* se destaca como espécie nativa, devido a sua capacidade de adaptar em vários ambientes e pela sua larga distribuição no território brasileiro (JUDD et al., 2009; GERHARDT, 2018).

Em Mata Atlântica, *S. terebinthifolia* (Figura 5) é comumente encontrada na floresta estacional decidual, floresta estacional semidescidual, ombrófila densa e ombrófila mista (CARVALHO, 2003; GERHARDT, 2018). A morfologia de *S. terebinthifolia*, se altera conforme o meio, de arbustos a arbóreas. Além disso, exibe rápido crescimento e cresce em áreas degradadas (LORENZI, 2002; GERHARDT, 2018).

A espécie *S. terebinthifolia* é uma angiosperma perenifólia que exibe uma estrutura morfológica diferente, quando atinge 2 a 3 metros de altura é considerado arbusto e arborescente ao alcançar mais de 4 metros de altura. O tronco dessa planta é coberto com casca espessa, em geral tem formas curtas, tortuosas e redondas, onde os ramos plagiotrópicos (galhos) primários se desenvolvem e posteriormente lançam os ramos secundários, com desenvolvimento no horizontal em ângulos de inclinação distintos. A parte externa da casca do tronco possui cor escura, grossa, rugosa, sulcada, escamosa e áspera e que se solta em placas disformes. Por outro lado, a casca interna tem cor avermelhada, com estrutura fibrosa e cheiro com exsudação de terebintina, típico da espécie (NEVES, 2016; GERHARDT, 2018).

As flores de *S. terebinthifolia*, são formadas de pétalas brancas, elas são inflorescências paniculadas axilares e terminais, melíferas e pentâmeras, actinomorfas, diclinas, com cinco sépalas verdes, cinco pétalas brancas e disco nectarífero amarelo ouro, e contém duas épocas de floração concentrados de setembro a novembro e de janeiro a março (RUAS, 2016; GERHARDT, 2018). De acordo com Lorenzi (2002), o pólen é tricolporado, radiosimétrico, isopolar, e possui ornamentação reticulada, em torno de 20 μm de diâmetro no eixo polar. As flores masculinas têm dez estames com anteras dorsifixas amarelas e com gineceu diminuído, não possui óvulo funcional no interior do ovário. As flores femininas exibem gineceu com estigma trilobado, quase séssil, ovário súpero, unilocular. Têm óvulo único e androceu sem função, contém dez estames

diminuídos, com suas anteras indeiscentes (LENZI; ORTH, 2004b; NEVES et al., 2016; GERHARDT, 2018).

A espécie *S. terebinthifolia*, possui frutos, menores e medem 3 a 5 mm de diâmetro de natureza drupas redondas indeiscentes e têm aspectos lustrosos, suavemente achatados na parte do comprimento (GERHARDT, 2018). Pode ser encontrada em cachos suspensos, imaturo têm coloração verde e quando maduro modificam para vermelho. O exocarpo é constituído de camadas lignificadas de epiderme e hipoderme, exibem aparência luminosa, aromático, e com gosto adocicado e adstringente em razão da presença de taninos (JUDD et al., 2009; GERHARDT, 2018). Figura 5.

Figura 5 - Foto de espécime de *Schinus terebinthefolia* (Aroeira de praia).

Fonte: *http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/7976-2/*; **bjaodesheng.com**

Quanto à relevância socioeconômica, atualmente, *S. terebinthifolia* tem sido alvo de interesse no mercado nacional e internacional (LENZI; ORTH, 2004; PÉLA, 2014; GERHARDT, 2018). No mercado dos alimentos, os frutos são consumidos como especiaria, especialmente por seu gosto adocicado e suavemente apimentado (CARVALHO, 2003; INCAPER, 2016; GERHARDT, 2018). Ademais, devido ao seu potencial medicinal, o óleo essencial do fruto também tem sido alvo de interesse no mercado internacional. Porém, as técnicas de extração para a purificação do óleo precisam ser aprimoradas para atender as exigências do comercio internacional (NICOLINI; PUGET; MAZZA, 2009; GERHARDT, 2018). Outros estudos revelam que o caule de *S. terebinthifolia* pode ser usado para fabricação de móveis, como carvão e lenha, além disso, também é usado como bebidas e na produção de perfumes (KHALED et al., 2009; ROCHA, 2018).

Segundo o Carvalho (2003), a espécie *S. terebinthifolia*, tem sido usada como plantas ornamentais para o paisagismo no meio urbano. Além disso, também é empregada

em vários plantios para o reflorestamento das áreas degradadas e em procedimentos de reversão da mata ciliada e fortalecimento das dunas (SOUZA et al., 2001; BOROS, 2007; SOUZA et al., 2013, RUAS, 2016; GERHARDT, 2018).

Na indústria farmacêutica, a espécie *S. terebinthifolia* é empregada na produção de medicamentos através de compostos bioativos extraídos do óleo essencial e por outro lado, na indústria de cosméticos são aplicadas no desenvolvimento de cremes e sabonetes (AMORIM; SANTOS, 2003; GERHARDT, 2018).

Na agricultura, o emprego de *S. terebinthifolia* pode ser útil no combate às doenças e pragas. E por possuir atividade antifúngica, pode ser usada como alternativa ecológica para redução da aplicação de defensivos agrícolas. Estudo *in vitro* com *S. terebinthifolia* foi constatada e comprovada ação antifúngica dessa planta frente o fungo Botrytis (SANTOS et al., 2010; GERHARDT, 2018).

A utilização de plantas na medicina tradicional como fitoterápico corresponde a uma prática muito antiga adotada pelo homem para cura, prevenção e tratamento de diversos tipos de enfermidades. Portanto, há um aumento de interesse da comunidade cientifica em algumas plantas com potencial medicinal e isso tem promovido diversos estudos científicos na área da etnobotânico (LUCENA, et al., 2006; MARTORELLI, et al., 2011; GERHARDT, 2018). A Organização Mundial da Saúde estima~~-se~~ que em torno de 80% da população usa planta medicinal como medicamento e que 25 mil espécies de plantas têm sido utilizadas como alternativa terapêutica (LUCENA, et al., 2006; OLIVEIRA-JUNIOR, et al., 2013; GERHARDT, 2018).

A associação da cultura indígena e africana deu origem à utilização de plantas medicinais no território brasileiro. Na cultura indígena, esses saberes foram passados de geração em geração através dos pajés. E com relação aos povos africanos, as pessoas escravizadas na época colonial trazidos para o Brasil transportavam plantas oriundas de seu continente, muitas delas empregadas nas cerimonias religiosas e também com potencial medicinal (LORENZI; MATOS, 2008; SOARES, 2010).

Dentre as várias plantas medicinais, a planta *S. terebinthifolia* é frequentemente empregada na medicina alternativa e tem atraído atenção e interesse no comercio fitoterápico, por exibir compostos bioativos para o desenvolvimento de vários fármacos (MENDES et al., 2015; GERHARDT, 2018). A sua utilização na medicina alternativa foi relatada desde a primeira edição da “Pharmacopeia Brasileira” ~~e~~ publicada em 1926 (LUCENA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; CARVALHO et al., 2013; GERHARDT, 2018). Atualmente, a sua comercialização como droga terapêutica foi

aprovada pelo Sistema Único de Saúde e Agência Nacional de Vigilância (BULLA et al., 2015; ROCHA, 2018).

De acordo com Amorim e Santos (2003), na década de 90 foi veiculado no Brasil um produto farmacêutico em forma de gel que contém o extrato da casca de *S. terebinthifolia* para o tratamento da vaginose bacteriana. A pesquisa foi realizada com quarenta e oito participantes, mulheres portadoras de vaginose bacteriana sintomática. Onde, vinte e cinco participantes foram tratadas com a utilização de gel de *S. terebinthifolia*, sendo vinte e três tratadas com placebo. Os resultados do estudo revelaram uma taxa de cura de 84% nas participantes tratadas com gel e de 48% no grupo com placebo, comprovando o efeito do gel vaginal.

De acordo com os estudos na literatura, nos países da América Central e do Sul, a planta *S. terebinthifolia* é empregada como adstringente, cicatrizante, anti-inflamatório, antibacteriano, balsâmico, diurético e tônico, assim como no tratamento de febres, tumores e doenças do trato gastrintestinal, das vias respiratórias e urinárias (CORRÊA, 1978; CLEMENTE, 2006). No território brasileiro essa planta é usada como cicatrizante e anti-inflamatório principalmente, na região Nordeste (BÓRIO, 1973; NETO, 2012).

Após avaliação farmacológica foi constatado que o extrato aquoso da folha de *S. terebinthifolia* exibiu ação anti-inflamatória de aspecto não-esteroide no modelo de granuloma induzido por algodão em dorso do rato (MOURELLE et al., 1993; NETO, 2012). Outro estudo com fruto de *S. terebinthifolia*, também exibiu atividade anti-inflamatória, devido à presença dos metabólitos secundários como triterpeno, ácido masticadienóico e o ácido masticadienólico (schinol) e por esses metabólitos atuarem como inibidores específicos da enzima fosfolipase A_2 existente em pâncreas de porco, fluido sinovial humano e em venenos de abelha (JAIN et al., 1995; NETO, 2012).

A emulsão produzida do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* apresentou efeito cicatrizante e anti-inflamatório, sobre o modelo experimental de ferida aberta em dorso de rato (dose de 1,5 g/kg) e do ensaio de edema de pata induzido por carragenina (dose de 2,5 g/kg), respectivamente (SILVA, 1999; NETO, 2012). Por outro lado, este mesmo extrato apresentou atividade cicatrizante de anastomoses de cólon em ratos, após administração em dose única intraperitoneal de 100 mg/kg do extrato. Este fato foi constatado por meio de análise macroscópica e histológica (COUTINHO et al., 2006; NETO, 2012).

Além das propriedades medicinais acima citadas, *S. terebinthifolia*, contém atividades, antiúlcera, antisséptica e no tratamento de estomatites e ainda há outros

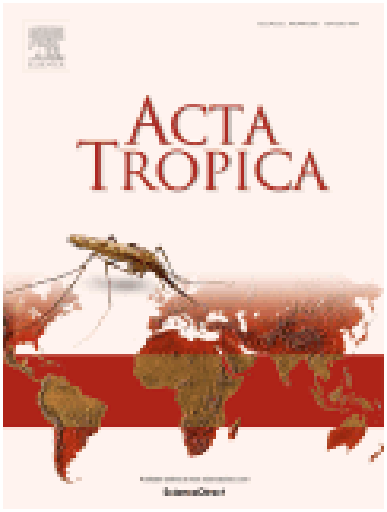
estudos que apontam a utilização da folha de *S. terebinthifolia* em alguns países, no tratamento de doenças venéreas, inflamação do útero, infecção do trato urinário, feridas de pele, diarreias e úlceras gastrointestinais (MARTINEZ et al., 1996; FREIRES et al., 2011).

Segundo Santana e colaboradores (2012), schinol e ácido masticardienóico são principais metabólitos secundários encontrados em *S. terebinthifolia*. Porém, na literatura, relatos indicam que tanto a casca quanto a folha de *S. terebinthifolia* possui uma grande quantidade de taninos e óleo essencial, onde a presença dos taninos é responsável pela classificação de aroeira como uma planta tanífera. Portanto, além de schinol e ácido masticardienóico outros metabólitos também podem ser encontrados em *S. terebinthifolia* como terebinthona, o ácido hidoximasticardienóico, o ácido terebintifólico e o ácido ursólico (AMORIM; SANTOS, 2003). Estudos também mostraram a presença de ácido gálico e elágico, entre outros metabólitos secundários em casca e folha de *S. terebinthifolia* (DEGASPARI et al., 2005; CAVALHER-MACHADO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; EL-MASSAR et al., 2009).

Até o momento, não há relatos na literatura sobre atividade tóxica ou moluscicida de *S. terebinthifolia* frente aos moluscos de *B. glabrata*, bem como quanto ao seu potencial esquistossomicida e antitumoral.

7 ARTIGO

7.1 Artigo 1- Atividade moluscicida e genotóxica do extrato bruto da casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi e suas frações sobre os moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*



Artigo a ser traduzido para o inglês, revisado e submetido ao periódico ACTA TROPICA no formato *Original Research Article* (**FI:** 2.52; **QUALIS CB II:** B1).

Artigo 1 Atividade **moluscicida e genotóxica do extrato bruto da casca de *Schinus terebinthifolia* Reddi e suas frações sobre os moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*.**

Resumo

Neste estudo, a fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia*, foram avaliados quanto à atividade moluscicida e genotoxicológica sobre os adultos de *Biomphalaria glabrata*. E toxicidade ambiental avaliada por meio de bioensaio com *Artemia salina*. As frações apresentaram atividade moluscicida. Para FAE a LC_{50} e LC_{90} foi de 43,95 e 76,66 μg/mL, enquanto que para F8-16 a LC_{50} e LC_{90} foram de 60,13 e 95,92 μg/mL, respectivamente. Os valores de LC_{90} estão dentro da faixa de concentração recomendada pela Organização Mundial da Saúde. O presente estudo também revelou que as frações de *S. terebinthifolia* apresentaram ação genotóxica, principalmente nas concentrações de 40 e 45 μg/mL, onde os índices dos danos ao DNA foram estatisticamente significativos (Newman-keuls; ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle negativo. As frações não apresentaram atividade tóxica sobre *A. salina*, ou seja, baixa toxicidade ambiental. Portanto, as frações da casca de *S. terebinthifolia* mostraram bons agentes moluscicidas contra adultos de *B. glabrata*.

Palavra chave: *Artemia salina*; *Biomphalaria*; moluscicida; vetor de esquistossomose; *Schinus terebinthifolia* Reddi.

1. Introdução

A esquistossomose constitui um problema sério para saúde pública em vários países tropicais e subtropicais, causando enormes consequências para o desenvolvimento desses países. A doença é encontrada em 78 países entre a Ásia, África, América e Oriente Médio (OMS, 2016). Esta enfermidade é ocasionada pelo helminto do gênero *Schistosoma* tendo como hospedeiro intermediário os planorbideos do gênero *Biomphalaria* e hospedeiro definitivo, o homem (Santos et al., 2008; Mendes et al., 2017). Estima-se que pelo menos 206,4 milhões de indivíduos estão infectados, dos quais cerca de 89 milhões foram tratadas e aproximadamente 200.000 indivíduos morrem por ano vítima desta enfermidade (OMS, 2016).

Na América latina, o Brasil é considerado o país com maior endemicidade, onde aproximadamente cerca de 1,5 milhões de indivíduos estão infectados. Entre 2006 e 2015, cerca de 500 indivíduos foram a óbitos por ano vítima da esquistossomose (Guia de Vigilância em Saúde - MS, 2017). Por ser uma doença crônica, que pode causar debilitações que refletem na produtividade econômica, a esquistossomose constitui um sério problema para as autoridades, fato que tem fomentado a implementação em larga escala de programas de controle desta patologia, com intuito de erradicá-la. Uma das estratégias de combate à doença é a utilização de moluscicida químico sintético para o controle de caramujos hospedeiros intermediários desta doença (Jatsa et al., 2015). A Niclosamida é a única substância sintética recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Santiária (ANVISA) e OMS disponível comercialmente. Porém, este moluscicida produz um impacto ambiental negativo ao ecossistema aquático, resistência de alguns moluscos, além do alto custo envolvido na sua aplicação (Marston; Hostettmann, 1985; WHO, 1988; Paraense, 2001; Santos et al., 2008; Rey, 2011; Mendes et al., 2017).

Por esta razão, tem sido estimulada a pesquisa, com substâncias de origem natural com atividade moluscicida como alternativa ao uso Niclosamida. As substâncias de origem vegetal são de fácil obtenção, biodegradáveis, podem exibir alta seletividade ao meio ambiente, possuem baixo custo e com potenciais atividades biológicas, em especial atividade moluscicida e entre outras. De acordo com a literatura, a atividade moluscicida dos extratos vegetais é atribuída à presença de metabolitos secundários como taninos, saponinas, terpenoides, esteroides e flavonoides. (Cantanhede et al., 2010; Hymete et al., 2005; Rey, 2001; Chifundera et al., 1993). Dentre estas classes de substâncias, taninos e

saponinas são compostos mais procurados quando se trata dos estudos de plantas medicinais com potencial moluscicida, por suspeitarem que esses compostos sejam responsáveis pela ação tóxica sobre os moluscos (Mendes et al., 2017).

Varias espécies ricas em polifenóis, em especial taninos, e em saponinas possuem relatos da atividade moluscicida, dentre estas espécies pode-se destacar *Schinus terebinthifolia* Raddi, que pertence à família Anacardiaceae, e é conhecida popularmente como aroeira-da-praia, sendo amplamente distribuída no Brasil. Tal espécie possui atividades biológicas descritas na literatura, dentre elas a ação analgésica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiúlcera, antioxidante, antifúngica e repelente térmita (Albuquerque; Oliveira 2007; Souza et al., 2007; Bendaoud et al., 2010; Napoleão et al., 2011; Barbieri et al., 2014). O aspecto fitoquímico de *S. terebinthifolia* revela a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, saponinas, açúcares e esteroides. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade moluscicida, cercaricida e genotóxica do extrato hidroalcóolico, da fração acetato e fração rica em compostos fenólicos da casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta do material

A casca de *Schinus terebinthifolia* foi coletada em Recife-PE, no bairro de Boa Viagem. O material coletado foi seco numa estufa de circulação de ar (40-45 ^{o}C) durante três dias. Os materiais foram coletados e processados seguindo as técnicas usuais em taxonomia, sendo depositados no Herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA)- Dárdano de Andrade Lima, sob o número de registros para e *Schinus terebinthifolia* 86.681.

2.2. Obtenção de extrato e frações das cascas de *Schinus terebinthifolia*

O extrato bruto (EB) foi obtido das cascas de *Schinus terebinthifolia* por maceração, utilizando a proporção droga: solvente 10% (p/v), e etanol (40%, v/v) como líquido extrator durante 72 horas. Em seguida, a solução foi filtrada, concentrada em evaporador rotativo (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida, congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O extrato bruto resultante foi solubilizado em água destilada na proporção 10% (p/v) e em seguida a solução obtida foi particionada por solventes de polaridade crescente

(acetato de etila - 10 vezes; n-butanol - 3 vezes). A fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa foram reunidas, concentradas em evaporador rotativo e posteriormente congeladas e liofilizadas (Bueno et al., 2012). Os extratos foram mantidos em dessecadores até a realização dos ensaios analíticos e biológicos.

2.3. Prospecção fitoquímica do extrato bruto da casca de *S. terebinthefolia* e suas frações

Para as análises por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio de sílica gel 60 F_{254} (Merck®). O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, saponinas, esteroides e triterpenoides) utilizou sistemas de solventes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996). A análise dos resultados foi realizada mediante observação dos cromatogramas sob luz branca e ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

2.4. Cromatografia em Coluna Aberta (CC)

A fração acetato de etila foi submetida a fracionamento por meio de cromatografia em coluna aberta utilizando Sephadex LH-20® como fase estacionária e metanol (MeOH) como fase móvel, com o objetivo de isolar as substâncias ativas (saponinas e compostos fenólicos). Portanto, foram coletados aproximadamente 15 mL por tubos e as frações foram monitoradas por CCD. A fração rica em compostos fenólicos (F8-16) foi obtida nesta fase.

2.4. Análise qualitativa e quantitativa da fração acetato de etila das cascas de *Schinus terebinthifolia* por CLAE

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram preparadas soluções estoque da FAE de *Schinus terebinthifolia* e dos padrões ácido gálico (98% de pureza, Vetec®), ácido elágico (>95% de pureza, Sigma®) e catequina (98% de pureza Sigma®).

As soluções foram preparadas em água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®), na concentração de 1 mg/mL para a fração acetato, e nas concentrações de 10 µg/mL para

as soluções padrão. As soluções foram filtradas em membranas de PVDF 0,45 μm (Chromafil®).

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific®), equipado com bomba binária com degaseificador e amostrador automático equipado com loop de 20 μL. Para a análise e processamento dos dados, foi utilizado o software Chromeleon 6.0 (Dionex, Thermo Fisher Scientific®, USA). A fase estacionária foi composta por coluna C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) da Dionex® equipada com pré-coluna (C_{18}, 4 mm × 3.9 μm, Phenomenex®); a fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B) ambas acidificadas com ácido trifluoroacético (0,05%). A eluição foi realizada em modo gradiente: 0–10 min, 12,5–25% B; 10–17 min, 25–40% B; 17–25 min, 40–70% B; 35–37 min, 75% B; 37–38 min, 75–10% B; o fluxo utilizado foi igual a 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 μL. A detecção foi realizada em 254, 270 e 280 nm, determinados de acordo com os máximos observados nos espectros de varredura dos picos dos padrões e amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os compostos foram identificados nas amostras através de comparação entre os tempos de retenção (t_R) do padrão e dos picos correspondentes presentes nas frações, além da análise de crescimento de área após fortificação da solução estoque da fração com as soluções padrão. Os teores de ácido gálico e/ou catequina foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\frac{\mathrm{Cp} \times \mathrm{AA}}{\mathrm{Ap} \times \mathrm{m}} \times \mathrm{FD} \times 100$$

Onde Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza do padrão); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra; FD = fator de diluição.

2.5. Bioensaios

2.5.1. Atividade Moluscicida em moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*

Moluscos adultos jovens da espécie *B. glabrata* pigmentados com diâmetro de concha entre 10 a 14 mm, obtidos do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, foram separados em grupos com 10 espécimes e acondicionados em recipientes contendo 60 ml de solução aquosa de FAE e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) da casca de *S.*

terebinthifolia nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. As soluções foram obtidas com auxílio do DMSO (0,5%). Para o controle negativo utilizou-se um grupo com água filtrada e DMSO a 0,5% e para o controle positivo foi utilizado uma solução de Niclosamida a 1 µg/mL (Bayluscide, Bayer). O tempo de exposição foi de 24 horas para fração acetato de etila (FAE) e 48 horas para F8-16 e os critérios para avaliação da mortalidade dos moluscos foram: imobilidade, liberação da hemolinfa, retração do molusco para dentro da concha e ausência de batimentos cardíacos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e observados durante 8 dias (WHO, 1965).

2.5.2. Teste do Micronúcleo

Para o teste do micronúcleo, moluscos adultos jovens da espécie *B. glabrata* pigmentado com diâmetro de concha entre 10 a 14 mm, foram separados em grupos com 5 espécimes e acondicionados em recipientes contendo 60 ml de solução aquosa de EB, FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia*, nas concentrações subletais de 30, 35, 40 e 45 µg/mL durante 48 horas. Após a exposição foram coletados aproximadamente 100 µL de hemolinfa de cada molusco e colocada sob lâminas microscópicas onde foram depositadas 100 µL de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) em solução de Ringer 10 mM. As lâminas produzidas foram colocadas em câmara úmida durante 40 minutos e em seguida, as células foram fixadas com 200 µL de glutaraldeído em solução de Ringer a 1% (v/v), durante 10 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução de Ringer e secadas à temperatura ambiente (25 °C), durante 24 horas. Após esse período as lâminas foram coradas com Giemsa (5%) por 8 a 10 min. Foram analisadas 1.000 células/grupo utilizando um microscópio óptico (Medilux), e os ensaios foram realizadas em triplicata.

2.5.3. Ensaio cometa

O ensaio alcalino cometa foi realizado de acordo com Singh e col. (1988) e Grazeffe e col. (2008), com poucas modificações. 100 µL de hemolinfa de *B. glabrata*, expostos a EH, FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia*, nas concentrações subletais de 30, 35, 40 e 45 µg/mL durante 48 horas e a água declorada (controle negativo), foram homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão (1:1). Imediatamente, este homogenato foi colocado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com

uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) dissolvida em PBS, (pH 7,4), coberto com lamínula e mantido a 4 °C (10 min). Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10 %, pH 10,0) por 12 h a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução de tampão alcalino, pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM).

A eletroforese foi realizada durante 20 min (4 °C) a 0,74 V/cm e 300 mA. Ao final, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) sob temperatura ambiente por 15 min e fixadas em álcool absoluto por 10 min. As lâminas, depois de secas, foram estocadas a 4 °C.

As lâminas foram coradas com 50 µL de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1:500). Os cometas foram analisados em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. O dano ao DNA dos hemócitos foi avaliado visualmente de acordo com o método de Collins e col. (2008). Cerca de 100 nucleóides foram contados para cada replica, totalizando 400 nucleóides. Estes foram classificados em 5 categorias de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4), dependendo da extensão do dano ao DNA (Figura 6). A categoria 0 indica que não ocorreram danos, enquanto as categorias de 1 a 4 indicam danos em níveis crescentes sobre o material genético.

Para avaliar o grau de dano ao DNA, foi utilizado o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%) como parâmetro. O ID foi calculado de acordo com a formula: ID = 0 (número de cometas categoria 0) + 1 (número de cometas categoria 1) + 2 (número de cometas categoria 2) + 3 (número de cometas categoria 3) + 4 (número de cometas categoria 4). O FD% foi calculado como o valor percentual de todos os cometas com dano ao DNA (categoria 1 – 4) em relação ao número total de cometas (categorias 0 – 4), de acordo com a fórmula:

$$FD\% = \frac{[(Nº\ total\ de\ cometas - N°\ de\ cometas\ categoria\ 0)100]}{Nº\ total\ de\ cometas}$$

2.5.4. Teste de Toxicidade ambiental

Os ovos de *Artemia salina*s foram colocados em recipiente com água do mar por 48 horas, com aeração e temperatura de 25 °C. Após a eclosão foram coletadas 10 larvas de *A. salina* e colocadas em tubos de ensaio de 5 mL com a FAE e F8-16 nas

concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. O controle negativo foi feito com uma solução de DMSO a 0,5% e água filtrada. O controle positivo foi realizado com a Niclosamida (Bayluscide, Bayer) em concentração de 1µg/mL. Foi avaliada a sobrevivência das larvas (Meyer, 1982). Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

2.5.5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste estatístico Newman-keuls para (atividade moluscicida e teste de micronúcleo) bonferroni para (teste de cometa) ($p< 0,05$) utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. O cálculo das concentrações letais foi realizado pelo método dos probitos através do programa StatPlus v5.

3. Resultados

3.1. Perfil fitoquímico do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

A fração de acetato obtida por meio da coluna aberta em gel de Sephadex LH-20 rendeu 20 frações, as quais foram analisadas por CCD. Esta análise permitiu a separação de dois grupos: as frações 3-7 apresentaram-se ricas em saponinas e as frações 8-16 apresentaram-se ricas em compostos fenólicos. As frações 8-16 foram reunidas e selecionadas para o experimento definitivo por apresentaram ação moluscicida após teste preliminar com os moluscos adultos de *B. glabrata*.

Na tabela 1 encontram-se as classes que apresentaram resultado positivo para a EB, FAE e F8-16. Os resultados foram evidenciados a partir da comparação do fator de retenção (F_R) e coloração das bandas das amostras que correspondiam aos padrões avaliados. Portanto, foi evidenciada a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, saponinas, açúcares, esteroides e terpenoides.

Tabela 1- Resultados do perfil fitoquímico do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) obtidos das cascas de *S. terebinthifolia* Raddi.

Classes (Padrão)	**EB**	**FAE**	**F 8-16**
Esteroides/Terpenos (β-sitosterol)	+	+	-
Saponinas (saponinas)	+	+	-
Flavonoides (quercetina)	+	+	+
Taninos hidrolisáveis (ácido gálico/ácido elágico)	+	+	+
Taninos condensados (catequina)	+	+	+

Sinal (+) indica a presença dos constituintes químicos e Sinal (-) indica a ausência dos constituintes químicos.

Nas análises por CLAE-DAD foram evidenciadas a presença de ácido gálico (pico 1, t_R = 8,87 min) e catequina (pico 2, t_R = 17,2 min) no EB, FAE e F8-16 (Figura 1) das cascas de *S. terebinthifolia* Raddi. A presença dos compostos foi confirmada pela co-injeção dos padrões e amostras, tempos de retenção e espectros de varredura dos picos (Figura 2).

Figura 6- Cromatograma obtido por CLAE para EB (A); FAE (B) e F8-16 (C) obtidos da casca de *S. terebinhifolia* Redd.

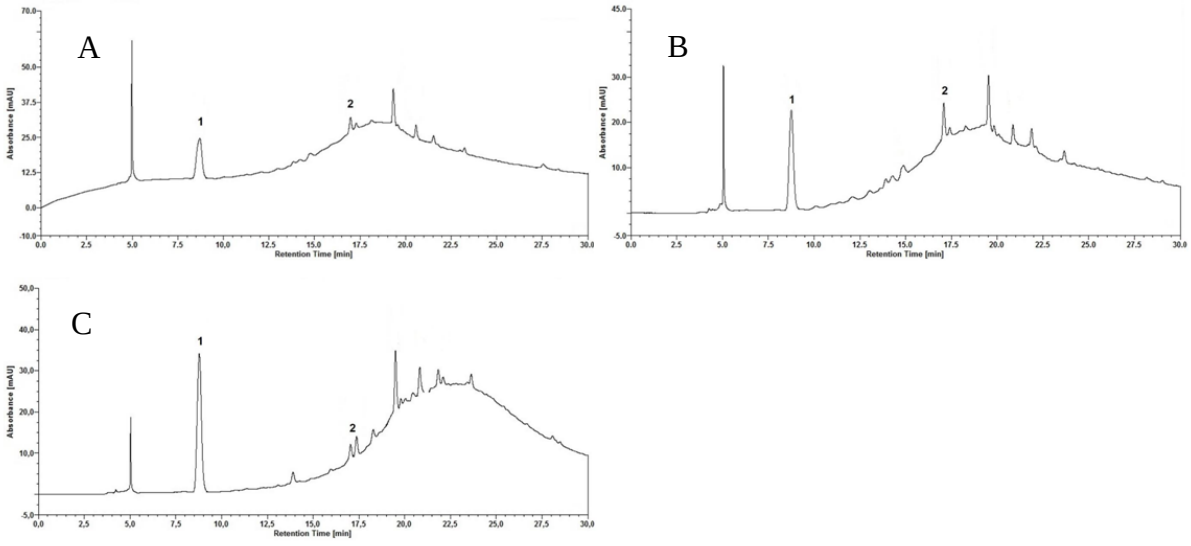
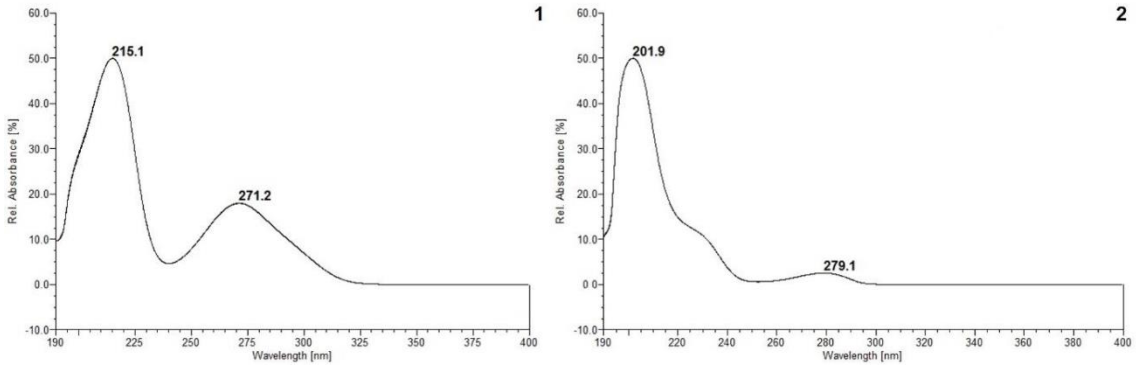


Figura 7- Espectros de varredura dos picos referentes à presença de ácido gálico e catequina na amostra evidenciados nas amostras da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.



As análises por CLAE-DAD também permitiram quantificar estes metabólitos nas amostras do EB, FAE e F8-16 como mostra a tabela 2. A FAE e F8-16 apresentaram maiores teores de ácido gálico e quando comparadas ao EB. Por outro lado, EB e F8-16 exibiram maiores teores de catequina.

Tabela 2- Teores de ácido gálico e catequina calculados nas amostras de *Schinus terebinthifolia* Raddi, obtidos por CLAE.

Amostras	g% AG	g% CAT
EB	0,17 (1,30%)	0,090000 (0,56%)
FAE	0,20 (2,20%)	0,089000 (0,05%)
F8-16	0,26 (2,13%)	0,097000 (0,15%)

EB: extrato bruto das cascas de *S. terebinthifolia;* FAE: fração acetato de etila das cascas de *S. terebinthifolia*; F8-16: fração rica em compostos fenólicos; g%: gramas de metabólito por 100 g de resíduo seco; AG: Ácido gálico; CAT: Catequina. Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo).

3.2. Atividade moluscicida dos adultos de *B. glabrata*

Para atividade moluscicida, os moluscos adultos de *B. glabrata* foram expostos a FAE e F8-16 em diferentes concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Portanto, a FAE e F8-16 foram ativos contra os moluscos adultos de *B. glabrata* e apresentaram valores de CL_{90} abaixo de 100 µg/mL (76,66 e 95,92 µg/mL). Porém, FAE foi mais ativo em comparação a F8-16 (Tabela 3).

Tabela 3- Valores calculados da concentração letal da fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos das cascas de *S. terebinthifolia* Raddi.

Amostra	LC_{50} µg/mL (95% LC)	LC_{90} µg/mL (95% LC)
	Adult - *B. glabrata*	
FAE	43,95 (40,15-47,75)	76,66 (72,86-80,46)
F8-16	60,13 (55,97-64,19)	95,92(91,76-100,08)

FAE: fração acetato de etila das cascas de *S. terebinthifolia* F8-16: fração rica em compostos fenólicos. Os resultados da inviabilidade foram expressos através da CL (95% LC): concentração letal (95% limite de confiança)

3.4. Teste do Micronúcleo

Para avaliar possível mecanismo ação dos extratos sobre os moluscos adultos de *B. glabrata* expostos a EB, FAE e F8-16 de *S. terebinthifolia*, foi empregado o teste de micronúcleo. Os hemócitos são principais células efetoras do sistema de defesa de dos moluscos e podem ser divididos em hialinócitos que possuem núcleo regular ao tamanho do citoplasma e granulócitos que têm mais citoplasma e formam pseudopodes.

A tabela 4 ilustra a média e desvio padrão de todas as alterações encontradas durante a contagem e análise dos hemócitos, incluindo micronúcleo, binucleação e apoptoses (Figura 3). Portanto, foi observado um aumento na frequência das alterações acima mencionadas de acordo com o aumento das concentrações, ou seja, apresentaram um comportamento dose-dependente.

Para os moluscos expostos ao EB nas concentrações de 40 e 45 µg/mL, a média da frequência de MN por 1000 células foi de 13 ± 2.82 e 20.5 ± 7.77, para a BC foi de 28.5± 4.94 e 40 ± 7.07 e em relação a apoptose a média foi de 59 ± 15.55 e 95.5 ± 4.94. Para a FAE da casca de *S. terebinthifolia* as maiores médias da frequência de MN, BC e AP também foram observadas nas altas concentrações de 40 e 45 µg/mL, onde a média da frequência de MN por 1000 células foi de 8.5 ± 2,12 e 14 ± 4,24, para BC a média foi de 21 ± 2.82 e 32 ± 4.24 e para apoptose a média da frequência foi de 73 ± 1.41 e 86.5 ± 17.67 (Tabela 4). Os moluscos adultos de *B. glabrata* submetidos a F8-16 nas concentrações de 40 e 45 µg/mL apresentaram a média da frequência de MN por 1000 células de 9 ± 2.82 e 12 ± 5.65, para BC a média foi de 26 ± 4.94 e 27 ± 9.89 e para apoptose a frequência foi de 31 ± 8.48 e 32 ± 4.24. É importante salientar que, a frequência de apoptose foi à alteração morfológica mais observada durante a análise e contagem dos hemócitos de moluscos adulto de *B. glabrata.* Portanto, este teste sugere que ação dos extratos e frações atua sobre o sistema de defesa do molusco, causando alterações morfológicas sobre os hemócitos do tipo apoptose celulares. Outra observação importante foi o aparecimento de hialinócito com granulação intensa e hialinócito trinucleado nas mais altas concentrações (Figura 3).

Figura 8- Hemócitos de B. glabrata após a exposição ao extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) de Schinus terebinthefolia. (A) Hemócito hialinócito com micronúcleo. (B) Hemócito granulócito binucleado. (C) Hemócitos granulócitos em apoptose. (D) Hemócitos hialinócitos trinucleado. (E) Hemócitos hialinócitos granulócito com granulação intense. (F) Hemócitos hialinócitos com vacúlos citoplasmatico.

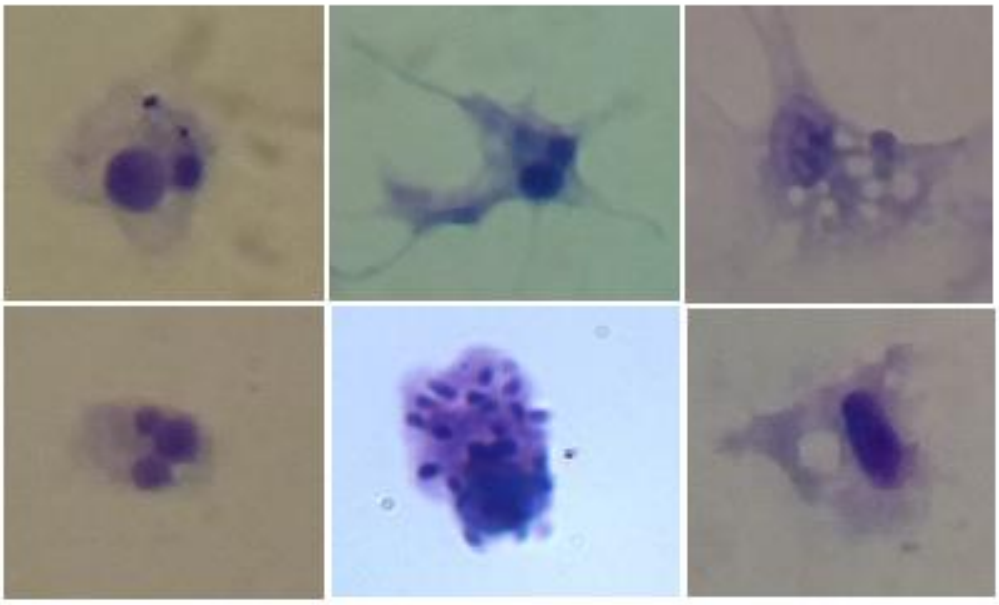


Tabela 4- Resultados das alterações morfológicas de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato bruto, FAE e F8-16 de *Schinus*

Concentração	EB			FAE			F8-16		
[µg/mL]	MN	BC	AP	MN	BC	AP	MN	BC	AP
C1	0,66 ± 0,57	1,0 ±1,0	6,0 ± 2,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,0 ± 2,0	0,0 ±0,0	2,6 ±0,5	4 ± 1,41
C2	0,66 ± 0,57	1,33 ± 0,57	2,33 ± 0,57	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,6 ± 2,51	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,6 ± 2,51
30	3 ± 0,0	10,0 ± 1,0	17,5 ± 0,70	4 ± 2,82	4 ± 0,0	14,5 ± 0,70	6,5 ± 3,53*	7,5 ± 4.94	20 ± 1.41*
35	8,5 ± 0,70*	23,66 ± 8,02	23,5 ± 7,77	5 ± 0,0*	11 ± 1,41*	26,5 ± 12,02**	7,5 ± 4,94*	23 ± 1.41*	21,5 ± 0,70*
40	13 ± 2,82**	28,5 ± 4,94**	59 ± 15,55**	8,5 ± 2,12***	21 ± 2,82**	73 ± 1,41***	9 ± 2,82*	26 ± 4,94*	31 ± 8,48**
45	20,5 ± 7,77***	40 ± 7,07**	95,5 ± 4,94***	14 ± 4,24***	32 ± 4,24***	86,5 ± 17,67***	12 ± 5,65**	27 ± 9,89*	32 ± 4,24**

terebinthefolius.

BC: Binucleação; AP: Apoptose; MN: Micronúcleo. C1: água filtrada. C2 (Controle 2): 0.5% DMSO em água filtrada; EB: extrato hidroalcóolico; FAE: fração acetato de etila; F8-16: fração rica em compostos fenólicos. * $p < 0,01$. ** $p < 0,001$. *** $p < 0,0001$.

3. 5. Ensaio cometa

Este ensaio foi utilizado para avaliar o mecanismo de ação de dos extratos da casca de *S. terebinthifolia* sobre o DNA das células de defesa dos moluscos em concentrações subletais. Os hemócitos dos moluscos adultos de *B. glabrata* tratados com diferentes concentrações (30, 35, 40, 45 µg/mL) do EB, FAE e F8-16, resultaram em danos do DNA significativos quando comparados ao controle negativo. Também foi observado um aumento no índice de danos de DNA de acordo com o aumento das concentrações, ou seja, foi observada uma dose dependente em todas as amostras testadas. As categorias de danos ao DNA 2, 3 e 4 foram incidentes em todas as doses testadas (Tabela 5) (Figura 4).

Portanto, os maiores índices de danos do DNA dos hemócitos de *B. glabrata*, tratados com diferentes concentrações do EB de *S. terebinthifolia* foi observado nas altas concentrações de 40 e 45 µg/mL foi de 136,50 ± 8,54 e 171,80 ± 22,76. Para FAE, os índices de danos de DNA observados nas altas concentrações foram de 235,6 ± 11,52 e 252,75 ± 36,37 (Tabela 7). A F8-16 da casca de *S. terebinthifolia* ocasionou mais danos no DNA em relação ao EB e FAE, no entanto, todas as concentrações utilizadas no teste apresentaram o índice de danos de DNA nas concentrações (40 e 45 µg/mL) de 345,67 ± 11,59 e 343,67 ± 17,62 (Tabela 5).

Figura 9- Nucleóides do ensaio de cometa para os hemócitos expostos ao extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F816). A categoria 0 indica que não ocorreu danos, enquanto as categorias de 1 a 4 indicam dano em niveis crescents sobre o material genético.

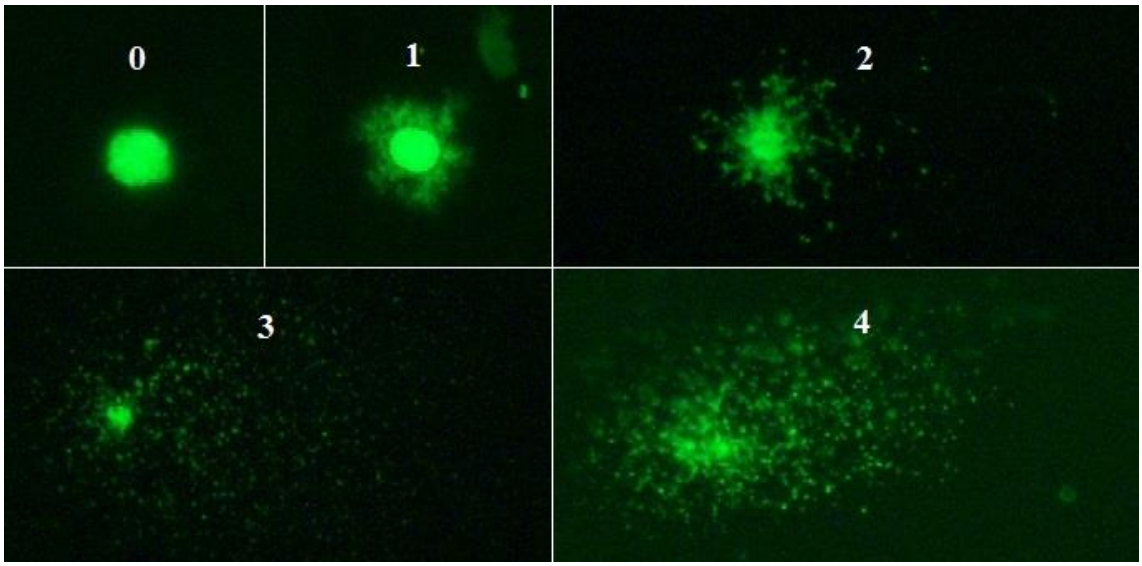


Tabela 5- Resultados de dano genético em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos de *Schinus terebinthefolius*.

Amostra	**Média e desvio padrão**					
[µg/mL]	**EB**		**FAE**		**F8-16**	
	Índice de Dano [a]	Frequência de dano (%)[a]	Índice de Dano [a]	Frequência de dano (%)[a]	Índice de Dano [a]	Frequência de dano (%)[a]
C1	27,25 ± 9,57	27,25 ± 9,57	27,25 ± 9,57	20,74 ± 4,58	27,25 ± 9,57	20,74 ± 4,58
30	107,00 ± 17,42**	90,37 ± 3,52***	135,6 ± 32,04***	73,5 ± 15,5	314,00 ± 11,75***	98,75 ± 1,50***
35	125,25±19,30***	95,49 ± 1,30***	202,25 ± 22,77***	91,5 ± 3,7	345,25 ± 21,31***	100,00***
40	136,50 ± 8,54***	94,00 ± 5,35***	235,6 ± 11,52***	97,6 ± 2,41	345,67 ± 11,59***	100,00***
45	171,80 ± 22,76***	97,40 ± 1,34***	252,75 ± 36,37***	97,01 ± 5,36	343,67 ± 17,62***	100,00***
MMS	339,67 ± 32,01***	99,67 ± 0,58***	339,67 ± 32,01***	99,67 ± 0,58***	339,67 ± 32,01***	99,67 ± 0,58***

[a] Média dos valores e desvio padrão obtidos a partir da contagem de 100 células por animal, experimento realizado em quintuplicata. C1: controle negativo; EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; F8-16: fração rica em compostos fenólicos, MMS: Metano sulfonato de Metila, controle positivo. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

3. 6. Teste toxicidade

Neste estudo foi observada que o extrato bruto da casca de *S. terebinthifoli*a e suas frações não causaram mortalidades das *Artemias salina*, demostrando ser atóxico ao meio ambiente.

4. Discussão

Os primeiros estudos direcionados as substâncias de origem vegetal como moluscicida aconteceu em 1930, com a planta nativa do deserto do Sudão, denominada *Balaniteae gyptiaca* L (Archibal, 1933). As primeiras pesquisas realizadas no Brasil sobre moluscicidas de origem vegetal foi com o extrato do caule de *Serjania* spp. (cipó- timbó) e de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão), demonstraram atividades frente ao molusco *B. glabrata* (PINTO e ALMEIDA, 1994). Outro estudo realizado por McCullough (1980) e os colaboradores e em parceria com WHO, relataram uma redução considerável da taxa de incidência e prevalência de *S. mansoni* no Nordeste da Etiopia, devido à utilização de substâncias de origem vegetal, *Phytolacca dodecandra* por cinco anos.

De acordo com Pereira Filho e colaboradores (2014), pesquisas detalhadas de perfil fitoquímico da planta é de grande relevância para a elucidação da atividade moluscicida. Além disso, também facilita para os pesquisadores no direcionamento para desenvolvimento de novas drogas. Na literatura, há vários estudos com extratos de plantas que sugere atividades moluscicida desses extratos devido à presença de metabolitos secundários, como taninos, saponinas, terpenoides, esteroides, flavonoides e entre outros, mas principalmente de saponinas e taninos (Mendes et al., 2018; Mandefro et al., 2017; Yang et al., 2017; Cantanhede et al., 2010).

A avaliação fitoquímica realizada neste trabalho demonstrou que o extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações, FAE e F8-16, indicaram a presença de diferentes metabolitos secundários envolvidos com atividade moluscicida, destacando-se principalmente os taninos. Portanto neste trabalho pode-se observar que as frações FAE e F8-16 do extrato da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram CL_{90} de 76,66 e 95,92 µg/mL, respectivamente, ou seja, abaixo de 100 µg/mL que é o valor preconizado pela organização mundial da saúde. Normalmente os testes realizados utilizam os extratos brutos das plantas, sendo poucos os testes com substâncias isoladas como os metabolitos secundários e princípios ativos, portanto os

resultados encontrados neste trabalho são importantes para entender e viabilizar o uso destas substâncias no combate aos moluscos.

Outro fato importante é elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias nos moluscos alvos. A elucidação desses processos necessita de estudos referente a caracterização do extrato, bem como a resposta fisiológica do molusco frente as substâncias químicas testadas. Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas com o objetivo de entender a atuação do EB e das frações FAE e F8-16 sobre o B. glabrata. A primeira técnica demonstrou que com o aumento da concentração das substâncias testadas houve um aumento expressivo no numero de alterações nas células de defesa do caramujo, ou seja, o teste do micronúcleo permitiu visualizar a ação do EB e suas frações FAE e F8-16 sobre as células de defesa do molusco, levando muitos hemocitos a apoptose celular.

O teste de micronúcleo é um dos testes de genotoxicidade frequentemente utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo*, onde frequência de micronúcleos revela as exposições de compostos com ação clastogênica e ou aneugênica, (Albertini et al., 2000; Pukalskienė et al., 2018). (Kirsch-Volders et al., 2011; Hayashi, 2016 Pukalskienė et al., 2018). Os dados encontrados neste trabalho são pioneiros, porém ao analisar a ação de outras substâncias como herbicidas sobre os moluscos *B. glabrata* foi constatado comportamento dose-dependente, ou seja, com o aumento da concentração do herbicida Oxifluofen foi observado um aumento no numero de MN e apoptose celular em hemocitos de *B. glabrata* (Lima et al., 2018). Dados semelhantes encontrados neste trabalho. Portanto pode-se observar que o estudo das alterações das células de defesa (hemócitos) dos moluscos *B. glabrata* pode ser considerado um ótimo teste para avaliar o mecanismo de ação de substâncias químicas sobre os moluscos *B. glabrata*.

A segunda técnica empregada, ensaio cometa, objetivou elucidar a ação do extrato e suas frações sobre o material genético das células de defesa do molusco. Os resultados demonstraram danos significativos sobre o DNA dos hemócitos (tabela 5). Estudos realizados por Ibrahim e Ghoname (2018), utilizando extrato aquoso de *Anagullis arvensis* em diferentes concentrações subletais, mostraram que os níveis de danos no DNA induzidos por essa planta apresentaram diferenças estatisticamente significadas quando comparados ao grupo controle negativo e que os níveis de dano refletem a diminuição da sobrevivência dos moluscos adultos de *B. alexandrina* expostos as concentrações subletais das substâncias. Este resultado corrobora o encontrado neste trabalho com *S. terebinthifolia*, o que sugere que doses letais ocorreram

devido a danos no DNA das células de defesa dos moluscos. Outro estudo realizado com nanopartícula de óxido cuproso sobre os hemócitos de *B. alexandrina*, e analisado pelo ensaio cometa, também detectou um aumento significativo nos níveis de danos no DNA (Shadoum et al. ,2016).

Portanto, os resultados do ensaio de cometa demostraram que esta técnica pode ser utilizada em estudos sobre o mecanismo de ação de substâncias com potencial ação moluscicida.

Outro aspecto relevante em relação ao extrato e seus metabolitos a serem utilizados no meio ambiente é a preocupação com outros componentes da biota aquática. Embora moluscicidas naturais sejam biodegradáveis, em determinadas concentrações, mesmo dentro dos valores exigidos pela OMS, os extratos podem revelar riscos ao ecossitema. Nesse contexto, faz-se necessário a realização de testes de toxidade, o que foi feito neste trabalho utilizando a Artemia salina. O resultado indica que tanto os extratos quantos suas frações possuem baixa toxicidade ambiental. Deferentes autores também utilizam este bioensaio para medir a toxicidade ambiental (Luna et al., 2005; Santos et al., 2007; Singh, 2005a).

5. Conclusão

Os resultados obtidos a partir da exposição dos organismos testados permitem concluir que as frações de FAE e F8-16 originária do extrato da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram atividade moluscicida contra moluscos adultos de *B. glabrata*, enquanto apresentam baixa toxicidade ao ambiente de acordo com o ensaio artemicida.

O teste do MN e ensaio cometa demonstrou que EB de *S. terebinthifolia* e suas frações FAE e F8-16 agem sobre as células de defesa do molusco *B. glabrata*, causado diferentes alteraçoes celulares nos hemocitos MN, BC e apoptose celular, além de causar danos significativos no DNA. Tanto o EB como suas frações possuem ação moluscicida e genotóxica frente ao molusco *B. glabrata*.

6. Referencias

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde., 2017. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde.

Cantanhede S. P. D., Marques AM, Silva-Souza N, Valverde A. L., 2010. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. Rev Bras Farmacogn.; 20: 282-6.

Chifundera K., Baluku B., Mashimango B., 1993. Phytochemical screening and molluscicidal potency of same zairean medicinal plants. Pharmacol Res 28: 333-340.

Dias, W. L. F., do Vale Junior, E. P., de Oliveira, M. D. D. A., Barbosa, Y. L. P., do Nascimento Silva, J., da Costa Júnior, J. S., & Martins, F. A., 2019. Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of Jatropha mollissima (Pohl) Baill leaves. *South African Journal of Botany*, *123*, 30-35. Gene Environ. 38 (18). http://dx.doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x.

Hayashi, M., 2016. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test.

Hymete A., Iversen T-H., Rohloff J., Erko B., 2005. Screening of Echinops ellenbeckii and Echinops longisetus for biological activities and chemical constituents. Phytomedicine 12: 675-679.

Ibrahim, A.M., & Ghoname, S.I., 2018. Molluscicidal impacts of Anagallis arvensis aqueous extract on biological, hormonal, histological and molecular aspects of Biomphalaria alexandrina snails. *Experimental parasitology*, *192*, 36-41.

Ibrahim, A.M., Ahmed, A.K., Bakry, F.A., & Abdel-Ghaffar, F., 2018. Hematological, physiological and genotoxicological effects of Match 5% EC insecticide on Biomphalaria alexandrina snails. *Ecotoxicology and environmental safety*, *147*, 1017-1022.

Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouju, A., Plas, G., Aardema, M.J., Fenech, M., 2011. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. Mutagenesis 26, 177–184.

Luna J.S., Santos A.F., Lima M.R.F., Omena M.C., Mendonça F.A.C., Bieber L.W., & Sant'Ana, A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activites of some medicinal plants from northeast Brazil. J Ethnopharmacol.; 97:199-206.

Mandefro, B., Mereta, S.T., Tariku, Y., & Ambelu, A., 2017. Molluscicidal effect of Achyranthes aspera L.(Amaranthaceae) aqueous extract on adult snails of Biomphalaria pfeifferi and Lymnaea natalensis. *Infectious diseases of poverty*, *6*(1), 133.

Marston A., Hostettmann K. Plant molluscicides. Phytochemistry., 1985; 24: 639-52.

Mendes, R.J.D.A., Pereira Filho, A.A., Nogueira, A.D.J.L., Araújo, K. R. F., França, C.R.C., Carvalho, I.B.D., Rosa, I.G.,2018. Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (Avicennia schaueriana, Laguncularia racemosa and Rhizophora mangle) and their effects on the bioactivity of Biomphalaria glabrata Say, 1818. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*., *60*.

Mendes, R. J. D. A., Pereira Filho, A. A., Nogueira, A. D. J. L., Araújo, K. R. F., França, C. R. C., Carvalho, I. B. D., ... & Rosa, I. G., 2018. Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (Avicennia schaueriana, Laguncularia racemosa and Rhizophora mangle) and their effects on the bioactivity of Biomphalaria glabrata Say, 1818. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *60*.

Oliveira, R.N.; Rehder, V.L.G.; Santos Oliveira, A.S.; Júnior, Í.M.; de Carvalho, J.E.; de Ruiz, A.L.T.G. et al., 2012**.** *Exp. Parasitol*.,132(2),135–43.

Pereira Filho, A. A., França, C. R. C., Oliveira, D. S. D. S., Mendes, R. J. D. A., Gonçalves, J. D. R. S., & Rosa, I. G., 2014. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of Jatropha gossypiifolia Linnaeus, 1753 on Biomphalaria glabrata (say, 1818). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *56*(6), 505-510.

Pukalskienė, M., Slapšytė, G., Dedonytė, V., Lazutka, J. R., Mierauskienė, J., & Venskutonis, P. R., 2018. Genotoxicity and antioxidant activity of five Agrimonia and Filipendula species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames Salmonella/microsome test. *Food and chemical toxicology*, *113*, 303-313.

Rey L,. 2001. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA.

SANTOS, O. C.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. SciELO-Editora FIOCRUZ., 2008.

Shaldoum, F.M., Khaled, M.Z., Ahmed, M.A., Sharaf El-Din, T.A., Abu-Senna, F.M., 2016. Biomphalaria alexandrina snails as a bio-monitor for water pollution using Genotoxic's effect of cuprous oxide nanoparticles and copper sulphate. 6, 189–197.

Silva, G.B.; Duarte, D.B.; Barros, E.J.G.; De Francesco Daher, E., 2013. *Asian Pacific J. Trop. Dis*.. 3(1),79–84.

WHO. Schistosomiasis. WHO. World Health Organization., 2014.

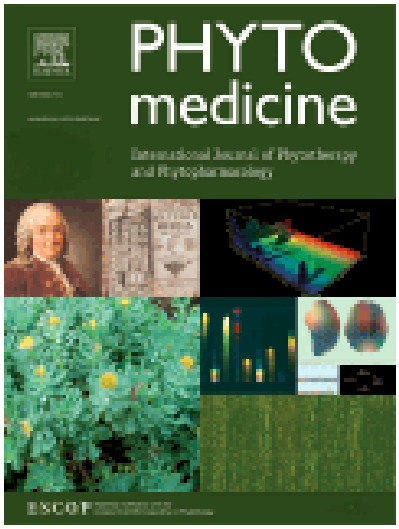
World Health Organization. Division of Vector Biology and Control., 1988. Data sheet on pesticides nº 63: niclosamide. Geneva: WHO.

World Health Organization. Report of the Scientific Working Groupon Plant., 1983. Geneva: WHO.

World Health Organization, Geneva., 2016. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis.

Yang, C., Zhang, M., Lei, B., Gong, G., Yue, G., Chang, X., & Chen, H., 2017. Active saponins from root of Pueraria peduncularis (Grah. ex Benth.) Benth. and their molluscicidal effects on Pomacea canaliculata. *Pest management science*, *73*(6), 1143-1147.

7.2 Artigo 2- Ação esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos da casca de *Schinus terebinthifolia* (Raddi) e sua frações de contra vermes de *Schistosoma mansoni.*



Artigo a ser traduzido para o inglês, revisado e submetido ao periódico PHYTOMEDICINE no formato *Original Research Article* (**FI:** 2.88; **QUALIS CB II:** B1).

Artigo 2. Ação esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos da casca de *Schinus terebinthifolia* (Raddi) e sua frações de contra vermes de *Schistosoma mansoni.*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade esquistossomicida do extrato bruto da casca (EB) de *Schinus terebinthifolia* e suas frações (FAE =fração de acetato; F8-16) sobre vermes imaturos e adultos de *Schistosoma mansoni*. Os vermes de *S. mansoni* nas fases adulta, jovem e esquistossomuloda linhagem BH foram utilizados para o estudo, sendo o efeito esquistossomicida avaliado por meio da analise da motilidade, viabilidade e alteração do tegumento. Os resultados desse estudo mostraram as concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL de EB e FAE causaram 100% da perda de motilidade ao longo do corpo dos esquistossômulos, enquanto que a F8-16, apresentaram 100% da perda de motilidade ao longo do carpo nas concentrações de 200 e 400 µg/ mL e 91,11% na concentração de 100 µg/mL. Para vermes jovens (21 dias), após o período de incubação, o EB e FAE causaram 100% da perda de motilidade ao longo do corpo dos vermes nas concentrações de 200 e 400 µg / mL. No entanto, após a exposição a F8-16 nestas mesmas concentrações, os vermes jovens não apresentaram motilidade ao longo do corpo (score 0). Para extrato bruto (EB) da casca de *S. terebinthifolia* causou 6,5 e 56,25% da perda de motilidade ao longo do corpo nos vermes adultos expostos às concentrações de 200 e 400 µg/mL. Para esta mesma concentração das FAE e F8-16 100% dos vermes adultos apresentaram perda total da motilidade ao longo do corpo. A viabilidade celular dos vermes adultos expostos às amostras de mostrou a diminuição da *S. terebinthifolia* diminuiu de acordo com aumento das concentrações. Os vermes de diferentes fases evolutiva (esquistossômulos, verme jovem e adulto) expostos às amostras de *S. terebinthifolia*, nas concentrações de 200 e 400 µg/mL apresentaram as seguintes alterações no tegumento: lesão focal, bolhas, danos na dobra tegumentares e tubérculos com redução de espículas, dobras coalescidas, sulcos profundos, descamação do tegumento e erosão na região da ventosa oral, aparecimento de orificios e entre outras alterações. Considerando os resultados deste estudo *in vitro* o extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações exercem efeito sob a motilidade de vermes adultos, jovens e esquistossomulo de *S. mansoni*, após 120horas de incubação.

Palavras chaves: esquistossomicidas, *Schistosoma mansoni*, *Schinus terebinthifolia* Raddi.

Introdução

A esquistossomose é uma infecção crônica causada por helmintos do gênero *Schistosoma* spp que apresenta importantes impactos na saúde humana e na economia (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al. 2013; CASTRO et al., 2016; WHO, 2017). A Esquistossomose é endêmica em 78 países e territórios na Ásia, África, Oriente Médio, América Central e do Sul (RASO et al., 2007; UTZINGER et al., 2009; AIRES et al., 2014), onde estima-se que 239 milhões de pessoas estejam infectadas, outras 779 milhões vivam em áreas de risco de infecção e que todos os anos cerca de 280.000 óbitos são decorrentes desta infecção (STEINMANN et al., 2006; UTZINGER et al., 2009; OMS, 2014; MORAES et al., 2013). As principais espécies de *Schistosoma* que parasitam os humanos são *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni*. A doença é causada primariamente pelo acumulo de ovos nos sistemas hepático-esplênico e urinário e no trato gastrointestinal, onde os ovos estimulam uma resposta inflamatória granulomatosa que posteriormente podem resultar em fibrose (Gryseels et al., 2013; Barsoum, et al., 2013).

Portanto, para o controle e tratamento desta doença a Organização Mundial de Saúde preconiza o uso de Praziquantel (PZQ), droga usada nas últimas décadas, por apresentar eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma.* Embora o PZQ apresente alta taxa de cura parasitária e baixos efeitos colaterais, sua eficácia é apenas contra vermes na fase adulta, uma vez que nas doses recomendadas não apresenta ação contra fases imaturas do verme (CAFFREY, 2015). Além da limitação contra vermes imaturos, é preocupante a existência de um único fármaco para o controle e tratamento de infecção em expansão e da existência de relatos de cepa de *Schistosoma* resistentes e/ou tolerantes ao PZQ (Moraes et al., 2013; OMS, 2014; Aires et al., 2014 Caffrey, 2015).

Diante da iminência de um colapso no uso do PZQ frente ao *Schistosoma*, a procura incessante de novos candidatos esquistossomicidas que atua não só em fase adulta, mas em todas as fases evolutivas do parasito tem sido um desafio continuo para a academia e indústrias farmacêuticos (Mantawy; Rizk, 2011; Abdel-Hafeez et al., 2012; Castro et al., 2016). Nas ultimas décadas há um aumento de interesse em buscar substancias extraídas de espécies vegetais com potencial medicinal para o tratamento de doenças parasitárias e entre elas merece destaque *Schinus terebinthifolia* Raddi popularmente conhecida por aroeira da praia.

A espécie *S. terebinthifolia* é considerada uma planta nativa do Sul e Centro das América havendo relatos da sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais da África e dos

Estados Unidos (Dvorkin-Camiel, 2008; Vieira et al., 2015). Entre as regiões do Brasil, *S. terebinthifolia* encontra-se distribuído, na região Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste (Estevão et al., 2015). *É* uma planta nativa do semiárido brasileiro, conhecida e decantada na Região Nordeste, principalmente no bioma Caatinga e pertence à família Anacardiaceae.

De acordo com a literatura, o rastreamento fitoquímicos realizados com o gênero *Schinus*, revelaram a presença de terpenóides, ácidos graxos em *S. molle* e em *S. terebinthifolia* (Ceruks et al., 2007). Outros relatos demostraram que no perfil fitoquímica de *S. terebinthifolia* também mostra a encontram-se metabólitos como: compostos fenólicos simples, flavonoides e taninos, óleo essencial, esteroides, terpenoides, antraquinonas e saponinas (Lawrence, 1984; Lima et al., 2006). Sabe-se que compostos fenólicos são tóxicos a vermes adultos de Schistosoma o que torna a avaliação da aroeira da praia como esquistossomicida impressidivel (Salloum et al. 2012; Alvarenga et al. 2016; Eraky et al. 2016).

O *S. terebinthifolia* possui uma grande importância na medicina popular e de acordo com a literatura, essa espécie é tradicionalmente usada no tratamento de ulcera, problemas respiratórios, feridas, reumatismo, gota, tumor, diarreia, doenças de pele, artrite (Morton, 1978; Lima et al., 2009). Além disso, há relatos do uso de *S. terebinthifolia* como antiseptico, anti-inflamatório e outras enfermidades (Medeiros et al., 2007; Lima et al., 2009). Porem nenhum relato literário foi encontrado sobre possível ação parasitaria desta espécie. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar ação esquistossomicida *in vitro* dos extratos brutos e frações de *Schinus terebinthifolia* (Raddi) contra vermes imaturos e adultos de *Schistosoma mansoni*.

Materiais e Métodos

Coleta do material

A casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi foi coletada em Recife-PE, no bairro de Boa Viagem. O material coletado foi seco numa estufa de circulação de ar (40-45 ^{o} C) durante três dias. Os materiais foram coletados e processados seguindo as técnicas usuais em taxonomia, sendo depositados no Herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA)- Dárdano de Andrade Lima, sob o número de registros para e *Schinus terebinthifolia* Raddi 86.681.

Obtenção de extrato e frações das cascas de *Schinus terebinthifolia* Raddi

O extrato bruto (EB) foi obtido das cascas de *Schinus terebinthifolia* por maceração, utilizando a proporção: solvente 10% (p/v), e etanol (40%, v/v) como líquido extrator durante

72 horas. Em seguida, a solução foi filtrada, concentrada em evaporador rotativo (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida, congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O extrato bruto resultante foi solubilizado em água destilada na proporção 10% (p/v) e em seguida a solução obtida foi particionada por solventes de polaridade crescente (acetato de etila - 10 vezes; n-butanol - 3 vezes). A fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa foram reunidas, concentradas em evaporador rotativo e posteriormente congeladas e liofilizadas, enquanto que a fação n-butanol foi reunida e seca em banho maria a 40 °C (Bueno et al., 2012). Os extratos foram mantidos em dessecadores até a realização dos ensaios analíticos e biológicos.

Prospecção fitoquímica da fração acetato de etila de *S. terebinthifolia* Raddi

Para as análises por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio de sílica gel 60 F_{254} (Merck®). O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, saponinas, esteroides e triterpenoides) utilizou sistemas de solventes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996). A análise dos resultados foi realizada mediante observação dos cromatogramas sob luz branca e ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

Cromatografia em Coluna Aberta (CC)

A fração acetato de etila foi submetida a fracionamento por meio de cromatografia em coluna aberta utilizando Sephadex LH-20® como fase estacionária e metanol (MeOH) como fase móvel, com o objetivo de isolar as substâncias ativas (saponinas e compostos fenólicos). Portanto, foram coletados aproximadamente 12 mL por tubos e as frações foram monitoradas por CCD.

Análise qualitativa e quantitativa da fração acetato de etila das cascas de *Schinus terebinthifolia* por CLAE

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram preparadas soluções estoque da FAE de *Schinus terebinthifolia* e dos padrões ácido gálico (98% de pureza, Vetec®), ácido elágico (>95% de pureza, Sigma®) e catequina (98% de pureza Sigma®).

As soluções foram preparadas em água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®), na concentração de 1 mg/mL para a fração acetato, e nas concentrações de 10 µg/mL para as soluções padrão. As soluções foram filtradas em membranas de PVDF 0,45 µm (Chromafil®).

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific®), equipado com bomba binária com degaseificador e amostrador automático equipado com loop de 20 µL. Para a análise e processamento dos dados, foi utilizado o software Chromeleon 6.0 (Dionex, Thermo Fisher Scientific®, USA). A fase estacionária foi composta por coluna C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) da Dionex® equipada com pré-coluna (C_{18}, 4 mm × 3.9 µm, Phenomenex®); a fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B) ambas acidificadas com ácido trifluoroacético (0,05%). A eluição foi realizada em modo gradiente: 0–10 min, 12,5–25% B; 10–17 min, 25–40% B; 17–25 min, 40–70% B; 35–37 min, 75% B; 37–38 min, 75–10% B; o fluxo utilizado foi igual a 0,8 mL /min e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada em 254, 270 e 280 nm, determinados de acordo com os máximos observados nos espectros de varredura dos picos dos padrões e amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os compostos foram identificados nas amostras através de comparação entre os tempos de retenção (t_R) do padrão e dos picos correspondentes presentes nas frações, além da análise de crescimento de área após fortificação da solução estoque da fração com as soluções padrão. Os teores de ácido gálico e/ou catequina foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\frac{\mathrm{Cp} \times \mathrm{AA}}{\mathrm{Ap} \times \mathrm{m}} \times \mathrm{FD} \times 100$$

Onde Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza do padrão); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra; FD = fator de diluição.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste estatístico Newman-keuls para bonferroni para (teste de cometa) ($p< 0,05$) utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

Bioensaios

Parasita

S. mansoni (cepa BH - Belo Horizonte, Brasil) é mantida através de passagens sucessivas em camundongos e Swiss no setor de esquistossomose experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Departamento de Medicina Tropical, ambas fazem parte da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Preparação de esquistossômulos de *S. mansoni* e teste esquistossomicida do extrato bruto e suas frações da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.

As cercárias de *S. mansoni*, obtidas do *B. glabrata* infectado (35 dias) após exposição à luz artificial (40°C, por 2 h), foram mecanicamente transformadas em esquistossômulos, como descrito por Ramalho-Pinto et al. (1974). Imediatamente, os esquistossômulos foram lavados quatro vezes em meio RPMI 1640 suplementado (HEPES 20 mM, 100 μg/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino), distribuídos em placas de cultura de 24 poços (30 vermes / poço) e incubado por 5 horas a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO2. Após esse período de incubação, os esquistossômulos foram expostos ao extrato bruto e suas frações (solubilizado em meio RPMI 1640 suplementado) até uma concentração final de 25, 50, 100, 200 e 400 μg/mL. Os vermes do grupo controle foram separados em controle negativo e positivo (PZQ 10 μM) em meio RPMI 1640 suplementado. Dois experimentos independentes (90 vermes jovens por concentração) foram realizados em triplicata (Pereira et al., 2015).

Infecção, animais e considerações éticas.

Os camundongos foram obtidos e mantidos no biotério do LIKA, em ambiente controlado (20 ± 2 °C, ciclo de luz diurno12 h) com acesso livre a alimentos (Labina®/Purina, São Paulo-SP) e água *ad libitum*. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do UFPE (Proc. No. 23076.013541/2017-76), dez camundongos Swiss fêmea de 30 dias pesando 28±2 g, foram infectados por via percutânea (Olivier e Stirewalt, 1952) com cerca de 120 cercárias de *S. mansoni* (linhagem BH), mantidas no Laboratório Experimental de Esquistossomose do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA / UFPE e no Departamento de Medicina Tropical da UFPE.

Preparação de vermes jovem de *S. mansoni* e teste esquistossomicida do extrato bruto e suas frações da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.

Vinte e um dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os vermes foram recuperados assepticamente por perfusão do sistema portal com soro fisiológico estéril (NaCl a 0,9% p / v) (Smithers e Terry, 1965). Os vermes jovens foram imediatamente transferidos para um meio RPMI 1640 suplementado (HEPES 20 mM, 100 μg / mL de penicilina, 100 μg / mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, sendo enxaguadas quatro vezes com este meio). Em seguida, os vermes foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços com 2 mL desse meio (20 vermes por poço) e incubados a 37 ° C em uma atmosfera

úmida contendo 5% de CO2. Após 2 h para permitir a adaptação dos vermes, foi adicionado PS-UA (solubilizado em meio de cultura RPMI 1640) a uma concentração final de 200, 100, 50, 25 e 12,5 μM. Os vermes do grupo controle foram separados em controle negativo e positivo (PZQ 10 μM) em meio RPMI 1640 suplementado. Dois experimentos independentes (60 vermes jovens por concentração) foram realizados em triplicata (Pereira et al., 2015).

Pesquisa *in vitro* com *S. mansoni*

Sessenta dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados pelo deslocamento cervical e os vermes foram recuperados assepticamente por perfusão do sistema porta e veias mesentéricas com solução salina estéril (0,9% NaCl w/v) (Smithers and Terry, 1965). Os casais vermes intactos foram imediatamente transferidos para um meio RPMI 1640 suplementado com 20 mM de HEPES, 100 μg/mL de penicilina, 100 μg / mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, sendo lavadas duas vezes com este meio. Em seguida, os vermes foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços com 2 mL desse meio (dois casais de vermes por poço) e incubados a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO2. Duas horas após a incubação, adicionou-se o EB, FAE e fração rica em compostos fenólicos em diferentes concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 μg / mL (a partir de uma solução mãe de 1000 μg / mL em RPMI 1640 / 1,5% de dimetilsulfóxido- DMSO). Os vermes do grupo controle foram separados em controle negativo e positivo (PZQ 10 μM) em meio RPMI 1640 suplementado. Todos os experimentos foram realizados seis vezes (n = 12 vermes por grupo de estudo) e repetidos pelo menos duas vezes.

Critérios de avaliação da atividade esquistossomicida

Motilidade e sobrevivência

Um microscópio invertido e um estereomicroscópio foram usados para avaliar a motilidade e a sobrevivência de vermes monitorados em 24, 48, 72, 96 e 120h de incubação. A motilidade e a sobrevida dos vermes foram avaliados de acordo com os critérios pontuados em uma escala de viabilidade de 0 a 3 proposta por Horiuchi et al. (2005). O sistema de pontuação foi o seguinte: 3, movimento completo do corpo; 2, movimento reduzido ao longo de todo corpo;1, movimentação apenas nas extremidades ou em apenas uma das extremidades e 0, ausência do movimento. O tratamento foi considerado letal quando nenhum movimento de vermes foi observado por mais de 2 min.

Teste de viabilidade

A viabilidade dos vermes de *S. mansoni* após o tratamento foi determinada pelo teste de citotoxicidade baseado no brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com condições previamente relatadas por Bertão et al. (2012). Resumidamente, dois casais de vermes foram colocados em poços individuais em placas de 96 poços contendo 100 µl de MTT (5 mg / ml em solução salina tamponada com fosfato, PBS) e incubados a 37 ° C durante 30 min. Posteriormente, a solução de MTT foi substituída por 200 µl de DMSO, com o propósito de dissolver os cristais púrpura de formazano, e a densidade óptica medida a 550 nm, num leitor de microplacas (M680, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Novamente, como grupos controle, dois casais de *S. mansoni* foram incubados na presença de 1,5% DMSO em RPMI 1640 (controle negativo), ou expostos a 10 lM PZQ (controle positivo) para os mesmos intervalos de tempo e condições experimentais. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise ultraestrutural da atividade do EB, FAE e frações ricas em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia* contra vermes adultos de S. mansoni, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os Vermes incubados em 25 ou 400 µg / mL do EB, FAE e frações ricas em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia* por 24, 48, 72, 96 e 120 h foram fixados com 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão de sódioacodilato (pH 7,2) por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com 1% (p / v) de OsO4 num tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 1 h à temperatura ambiente. Os espécimes foram então desidratados com concentrações crescentes de etanol e depois secos com CO2 líquido em uma máquina secadora de ponto crítico (Hitachi HCP-2, Hitachi, Japão). Os espécimes tratados foram montados em tiras de microscopia de alumínio e revestidos com partículas de ouro usando um aparelho de pulverização de iões FINECOAT 1100 (JEOL, Tóquio, Japão). Os espécimes foram então observados e fotografados usando um microscópio eletrônico (JEOL-25SII, Tóquio, Japão).

Resultados

Atividade esquistossomicida do extrato bruto e suas frações da casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi

Motilidade e sobrevivência dos esquistossômulos e vermes jovens de *S. mansoni*

A tabela 1 e 2 ilustra os resultados dos scores da motilidade das fases evolutivas de *S. mansoni*, esquistossômulo (5 horas) e verme jovem (21 dias), respectivamente, expostos ao EB, FAE e F8-16 em intervalo de tempo de 3, 6, 12 e 24 horas. Os resultados referentes aos esquistossômulos mostram que após 6h de incubação, a concentrações de 200 e 400 µg/mL do EB causaram 6.66 e 75.56% da perda de motilidade ao longo do corpo (score 0) e 65.57 e 20% dos esquistossômulos apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência das ventosas no fundo da placa de cultura (score 1,5). A exposição por 12h 95,56; 63,33 e 12.23% de esquistossômulos incubados em 100, 200 e 400 µg/mL do EB, respectivamaente, não apresentaram motilidade ao longo do corpo (score 0), enquanto que 12.23; 73.33 e 32.23% dos esquistossômulos incubados em 50, 100, 200 µg/mL do EB apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência no fundo da placa de cultura (score 1,5). Após 24 horas, 77.78, 93.33 e 100% dos esquistossômulos expostos às concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL do EB apresentaram uma completa ausência da motilidade ao longo do corpo (score 0). Enquanto que, 25.56 e 58.89% dos esquistossômulos incubados nas concentrações de 25 e 50 µg/mL do EB apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência no fundo da placa de cultura (score 1,5). Em 48h, 100% dos esquistossômulos expostos às concentrações de 200 e 400 µg/mL apresentaram uma completa ausência de motilidade ao longo do corpo (score 0). E após 120h, também foi observado que 81,11 e100% dos esquistossômulos expostos à concentração de 50 e100 µg/mL exibiram ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0) (Tabela 1).

Os resultados da FAE mostraram que, os esquistossômulos foram mais sensíveis a essa fração quando comparados com EB e F8-16. Onde, após 3h, 100% dos esquistossômulos incubados na concentração de 400 µg/mL apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência no fundo da placa de cultura (score 1,5). Em 6h, 61.11 e 88.89% dos esquistossômulos expostos às concentrações de 200 e 400 µg/mL exibiram uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0), enquanto, que 25.55 e 28.89% dos esquistossômulos apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência no fundo da placa de cultura (score 1,5), nas concentrações de 100 e 200 µg/mL da FAE. Em 12h de

incubação, 81.11 e 100% dos esquistossômulos apresentaram uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0). Ademais, 74.45% dos esquistossômulos apresentaram movimentos anteriores e ou posterior e sem aderência no fundo da placa de cultura (score 1,5), na concentração de 100 µg/mL. Após 24h de exposição, 66.67 e 100% dos esquistossômulos incubados nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL apresentaram uma completa ausência de motilidade ao longo do corpo (score 0), e 32.22 e 67.78% dos esquistossômulos expostos às concentrações de 25 e 50 µg/mL exibiram movimentos anteriores e ou posterior sem aderência das ventosas no fundo da placa de cultura (score 1,5). Em 96h 100% dos esquistossômulos expostos às concentrações de 100; 200 e 400 µg/mL apresentaram uma completa ausência de motilidade ao longo do corpo (score 0). E após 120 horas também foi observado que 36.67 e 66.66% dos esquistossômulos expostos à concentração de 25 e 50 µg/mL exibiram uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0) (Tabela 1).

Os resultados relacionados à F8-16 nos permitem constatar que após 12h de exposição, 76.67% dos esquistossômulos incubados na concentração de 400 µg/mL exibiu uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0), enquanto que 68.89% dos esquistossômulos expostos à concentração de 200 µg/mL exibiram motilidade anteriores e ou posterior sem aderência das ventosas no fundo da placa de cultura (score 1,5). Em 24h, 80 e 100% dos esquistossômulos expostos às concentrações concentração de 200 e 400 µg/mL exibiram uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0), e 52.23% dos esquistossômulos expostos à concentração de 100 µg/mL exibiram motilidade anteriores e ou posterior sem aderência das ventosas no fundo da placa de cultura (score 1,5). Após 48 horas, 100% dos esquistossômulos expostos às concentrações concentração de 200 e 400 µg/mL exibiram uma completa ausência do motilidade ao longo do corpo (score 0) e 71.11, 51.11 e 82.22% dos esquistossômulos expostos à concentração de 25, 50 e 100 µg/mL exibiram motilidade anteriores e ou posterior sem aderência das ventosas no fundo da placa de cultura (score 1,5). E após 120h, a F8-16 na concentração 100 µg/mL causou 91.11% de mortalidade aos esquistossômulos, onde foi observada uma completa ausência de motilidade ao longo do corpo (score 0) (Tabela 1).

Para vermes jovens, foi observado no primeiro intervalo de observação de 3h que 88.33 e 95.67% dos vermes jovens incubados as concentrações de 200 e 400 µg/mL do EB apresentaram motilidades em uma ou ambas as extremidades, comprometimento de suas capacidades de aderirem no fundo de placa de cultura e ausência de peristaltismo de órgãos

internos (score 1). Após 12h de exposição, 85 e 100% dos vermes jovens expostos às concentrações de 200 e 400 µg / mL do EB, apresentaram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo (score 0). Em 24h, 40, 95 e 100% dos vermes jovens expostos às concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL do EB, apresentaram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). E após 48h de incubação, 100% dos vermes jovens expostos às concentrações de 200 e 400 µg/mL apresentaram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0), enquanto que em 48 e 120 horas, 45 e 61.66 dos vermes jovens incubados na concentração de 100 µg/mL apresentaram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0) (Tabela 2).

Os resultados da FAE mostram que depois de 3h de exposição, as concentrações de 200 e 400 µg/mL causaram redução na motilidades em 85 e 100% dos vermes jovens, onde foi observado movimento em uma ou ambas as extremidades, comprometimento de suas capacidades de aderir no fundo de placa de cultura e ausência de peristaltismo de órgãos internos (score 1), e 40 e 30% dos vermes jovens expostos as concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram redução da motilidade ao longo do corpo e peristaltismo de órgãos interno (score 2). Em 6h, 100% dos vermes jovens expostos às concentrações de 400 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0), enquanto que em 6, 12 e 24h, 65, 71.67 e 83.33% dos vermes jovens incubados na concentração de 200 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). Em 96h 100% dos vermes jovens expostos às concentrações de 200 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). Enquanto que 50% dos vermes jovens expostos às concentrações de 100 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0) (Tabela 2).

Os resultados relacionados à F8-16 mostram que em12 e 24h, 43.33 e 85% dos vermes jovens expostos à concentração de 400 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). Ademais, 21.67 e 61% dos vermes jovens expostos à concentração de 200 µg/mL também apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). Após 48 horas, 100% dos vermes jovens expostos à concentração de 400 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score

0), enquanto que a concentração de 200 µg/mL causou 65% da perda das motilidades ao longo do corpo e peristaltismo dos órgãos internos (score 0). E após 120h, 96.67% dos vermes jovens expostos à concentração de 200 µg/mL apresentou uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0). Enquanto que a concentração de 100 µg/mL causou 31.67% da perda na motilidade ao longo do corpo e peristaltismos dos órgãos internos (score 0) (Tabela 2).

Alteração da motilidade e viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*.

Na tabela 3, 4, 5 e 6 ilustra os resultados da alteração das motilidades e viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, provocadas pela presença do extrato bruto (EB) da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações (FAE e frações ricas em compostos fenólicos-F 8-16) em todos os intervalos de tempo de acordo com os scores da motilidade. Entretanto, na tabela 3, após 24 horas de exposição, 31.25% dos vermes adultos expostos às concentrações de 400µg/ mL do EB, exibiram motilidade em uma ou ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem no fundo da placa de cultura (score 1) enquanto que, 56.25% dos vermes adultos apresentaram diminuição na motilidade ao longo dos corpos (score 2). E 93.75 e 100% dos vermos adultos expostos à concentração de 25, 50, 100 e 200 µg / mL do EB, não apresentaram alterações na motilidade dos vermes adultos (score 3).

Após 120 horas de exposição, 6.5 e 56,25% dos vermes expostos às concentrações de 200 e 400 µg / mL do EB da casca de *S. terebinthifolia*, apresentaram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo (score 0), enquanto 25 e 18.75% dos vermes adultos apresentaram motilidades em uma ou ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem no fundo da placa de cultura (score1). E 18.75 e 75% dos vermes adultos apresentaram diminuição da motilidade ao longo do corpo e comprometimento de suas capacidades de aderirem no fundo de placa de cultura (score 2). Nas concentrações de 25, 50 e 100 µg / mL, 50, 62,5, e 62,5 % dos vermes adultos também apresentam diminuição na motilidade ao longo do corpo e comprometimento de suas capacidades de aderirem no fundo de placa de cultura (score 2). Enquanto que 50; 37.5 e 37.5% dos vermes adultos não apresentaram alterações na motilidade (score 3). Além, das alterações na motilidade e viabilidades dos vermes também foi evidenciadas outros parâmetros como desacasalamentos dos casais, onde após 120 horas de exposição 83,33, 100 e 100% dos casais se encontra

desacasalados com alta frequencia nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL da EB, respectivamente (tabela 6). Ademais, também foi observado negrecimento dos vermes em quase todas as concentrações utilizadas no teste.

Na tabela 4, entre 43.75% dos vermes adultos expostos às concentrações de 400 µg / mL da FAE exibiram uma ausência completa da motilidade ao longo do corpo (score 0), enquanto que 56.25, 93.75 e 56.25% dos vermes expostos, respectivamaente à concentração de 100, 200 e 400 µg / mL da FAE da casca de *S. terebinthifolia*, apresentaram motilidade em uma ou ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 1). E 100 e 75% dos vermes adultos expostos às concentrações de 25 e 50 µg/mL FAE da casca de *S. terebinthifolia*, não apresentaram alterações na motilidade (score 3). Alterações na motilidade dos vermes após 24 horas. Ademais, foram observado comprometimento da capacidade dos vermes em aderir no fundo da placa de cultura. Após 96 horas de exposição foram observados uma ausência completa da motilidade dos vermes (score 0) na concentração de 400 µg / mL da FAEda casca de *S. terebinthifolia*. E após 120 horas de exposição, 100% dos vermes adultos apresentaram perda total na motilidade (score 0) nas concentrações de 200 e 400 µg/mL da FAEda casca de *S. terebinthifolia*. E nas concentrações de 50 e 100 µg/mL da FAE da casca de *S. terebinthifolia*, 50 e 81.25% dos vermes adultos apresentaram diminuição na motilidade em uma ou ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 1), enquanto que na concentração de 25 e 50 µg/mL da FAE da casca de *S. terebinthifolia*foi observada diminuição da motilidade ao longo dos corpos e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura, em 75 e 50% dos vermes adultos (score 2). E apenas 25% dos vermes adultos expostos à concentração de 25 µg/mL da FAE da casca de *S. terebinthifolia*, não apresentaram alterações na motilidade (score 3). Durante a avaliação das alterações na motilidade e viabilidade dos vermes, também foram observados que após 120 horas de exposição 50, 100 e 100% dos casais desacasalaram com mais frequência nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL da FAE, respectivamente (tabela 6). E também foi observado o negrecimento dos vermes em todas as concentrações e intervalos de tempo utilizado no bioensaio.

Em tabela 5, ilustra os resultados dos vermes expostos a fração rica em compostos fenólicos. Portanto, em 24 horas após o tratamento, 43.75% dos vermes adultos de *S. mansoni*expostos à concentração de 400 µg/mL da F 8-16 apresentaram motilidade em uma ou

ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 1). Enquanto que 18.75, 37.5 e 43.75% dos vermes adultos expostos às concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL apresentaram diminuição da motilidade ao longo dos corpos e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 2). E 100 e 81.25% dos vermes adultos expostos às concentrações de 25 e 50 µg/mL da F 8-16 não apresentaram alterações na motilidade (score 3). E após 120 horas, as concentrações de 200 e 400 µg / mL causaram 100% de mortalidade aos vermes adultos de *S. mansoni*, onde foram observadas uma ausência completa na motilidade ao longo do corpo (score 0) enquanto que, as concentrações de 25 e 50 µg/mL, causaram 12,5 e 25% de mortalidade aos vermes adultos de *S. mansoni* (score 0). E 31.25, 37.5 e 75% dos vermes adultos expostos às concentrações de 25, 50, 100 µg/mL apresentaram motilidade em uma ou ambas as extremidades e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 1). Ademais, 68.75 e 50% dos vermes adultos expostos as concentrações de 25 e 50 µg/mL da F 8-16 apresentaram diminuição da motilidade ao longo dos corpos e comprometimento de suas capacidades de aderirem ao fundo da placa de cultura (score 2). As alterações como desacasalamentos foram observados em 66,67, 100 e 100% dos casais dos vermes adutos de *S. mansoni* após 120 horas de exposição com mais frequencia nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL da F8-16, respectivamente (tabela 6). Além, do negrecimento dos vermes adultos que também foram observadas em todas as concentrações e intervalos de tempo utilizado no teste.

A figura 1 mostra os resultados da viabilidade celular dos vermes adultos de *S. mansoni*, onde o EB na concentração de 400 µg/mL apresentou diferenças estatisticamente significativas ($^{*}P<0.05$) quando comparado ao grupo controle negativo. Enquanto que as demais concentrações (25, 50, 100 e 200 µg/mL) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle. Para FAE, as concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.001$ e ***P<0.0001) quando comparado ao grupo controle negativo, respectivamente. E apenas a concentração de 25 µg/mL não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo controle negativo, respectivamente. E com relação a F8-16, as concentrações de 200 e 400 µg/mL apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($^{*}P<0.05$ e $^{**}P<0.001$) quando comparado ao grupo controle negativo, respectivamente. E

restante das concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle.

Tabela 6- Scores de motilidade dos vermes esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* expostos à Praziquantel e extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.

Groups	**Mean ± standard deviation (SD) and percent of worms (%) in motility scores after incubation**											
	3 h			6 h			12 h			24 h		
	0	1.5	3	0	1.5	3	0	1.5	3	0	1.5	3
Ctrl Negat.			30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)
Ctrl PZQ 10 µM		30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)	
EB (µ/mL)												
25			30±0.0 (100%)		1.0±1.0 (5,56%)	29±1.0 (94.44%)		2.33±0.57 (12.23%)	26.33±2.08 (87.77%)	0.66±0.57 (2.22%)	7.66±1.15 (25.56%)	21.66±1.52 (72.22%)
50			30±0.0 (100%)		1.66±2.88 (5.56%)	28.33±2.88 (94.44%)	0.33±0.57 (1.11%)	5±3.46 (12.23%)	26±2.0 (86.66%)	0.66±0.57 (2.22%)	17.66±3.78 (58.89%)	11.66±4.16 (38.89%)
100			30±0.0 (100%)		2±1.0 (3.33%)	28.0±1.0 (96.67%)	3.66±1.15 (12.23%)	22±1.0 (73.33%)	4.33±0.57 (14.44%)	23.33±2.51 (77.78%)	6.66±2.51 (22.22%)	
50			30±0.0 (100%)	2±2.0 (6.66%)	17.33±1.52 (65.57%)	10.66±3.21 (27.77%)	19.33±2.88 (63.33%)	9.66±2.08 (32.23%)	1±1.0 (4.44%)	28±0.0 (93.33%)	2.±0.0 (6.67%)	
400			30±0.0 (100%)	22.66±3.51 (75.56%)	5.3±1.15 (20%)	1.33±2.30 (4.44%)	28.66±1.52 (95.56%)	1.33±1.52 (4.44%)		30±0.0 (100%)		
FAE (µ/mL)												
25			30±0.0 (100%)		1.33±1.15 (4.44%)	28.33±1.52 (95.56%)		1.33±1.52 (4.44%)	28.67±1.52 (95.56%)	0.67±1.15 (2.22%)	9.67±2.51 (32.22%)	19.67±1.52 (65.56%)
50			30±0.0 (100%)	0.33±0.57 (1.11%)	1.33±1.15 (4.44%)	28.33±1.52 (94.45%)	1±1.0 (3.33%)	1.67±0.57 (5.56%)	27.33±1.52 (91.11%)	1.67±1.52 (5.56%)	20.33±3.21 (67.78%)	4.33±5.13 (26.67%)

100		30±0.0 (100%)	0.67±0.57 (2.23%)	7.67±1.52 (25.55%)	21.67±1.52 (72.22%)	2±1.0 (6.66%)	22.33±3.21 (74.45%)	5.67±2.51 (18.89%)	20±3.60 (66.67%)	10±3.60 (30.34%)
200		30±0.0 (100%)	18.33±3.78 (61.11%)	8.67±2.88 (28.89%)	3±1.0 (10%)	23.67±5.13 (81.11%)	6.33±5.13 (18.89%)		30±0.0 (100%)	
400	30±0.0 (100%)		26.66±1.15 (88.89%)	3.33±1.15 (11.11%)		30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)	
F8-16 (µ/mL)										
25		30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)		2±1.73 (7.78%)	27.67±2.08 (92.22%)	0.33±0.57 (1.11%)	4.67±2.51 (16.67%)	24.67±1.52 (82.22%)
50		30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)		2±2.0 (10%)	27.67±2.30 (90%)	0.67±1.15 (1.11%)	7±2.64 (23.34%)	22.67±0.0 (75.55%)
100		30±0.0 (100%)			30±0.0 (100%)		3±2.0 (7.78%)	27±2.0 (92.22%)	1.33±1.52 (4.44%)	16±3.46 (52.23%)	13±2.64 (43.33%)
200		30±0.0 (100%)	0.33±0.57 (1.11%)		29.67±0.57 (98.89%)	0.33±0.57 (1.11%)	20.67±0.0 (68.89%)	9±5.29 (30%)	22.67±1.15 (80%)	7.33±1.15 (20%)	
400		30±0.0 (100%)	1.67±2.08 (5.56%)	20.33±4.04 (67.78%)	8±3.0 (26.66%)	23±1.73 (76.67%)	4.33±1.52 (14.44%)	2.67±0.57 (8.89%)	30±0.0 (100%)		

Ctrl Negat.= controle negativo. EB= extrato bruto; FAE= fração acetate de etila; F8-16= Fração rica em compostos fenólicos. Score 3 = Typical body movement and sucker in movement, adhering to the bottom or sides of the culture plate Score 1.5 = Reduced movement throughout the body and/or of anterior and posterior regions, absence of adhesion

Tabela 7- Scores de motilidade dos vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni* expostos à Praziquantel e extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.

Groups	**Mean ± standard deviation (SD) and percent of worms (%) in motility scores after incubation**															
	3 h				6 h				12 h				24 h			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ctrl Negat.				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)
Ctrl PZQ																
10 µM			20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)	
EB (µg/mL)																
25	1.33±0.57 (6.67%)			18.66±0,57 (93.33%)		1.33±0.57 (6.67%)	0.67±0.57 (3.33%)	18±0.0 (90%)		1.33±0.57 (6.67%)	0.67±0.57 (3.33%)	18±0.0 (90%)		1±1.0 (5%)	5.67±0.0 (28.33%)	20±0.0 (66.67%)
50	0.67 ±0.57 (3.33%)			19.33±0.57 (96.67%)	0.33±0.57 (1.67%)	0.67±0.57 (3.33%)	1.67±1.52 (8.33%)	17.67±0.57 (86.67%)	0.33±0.57 (1.67%)	1±0.0 (5%)	1.33±1.15 (6.67%)	17.33±0.57 (86.67%)	0.67±0.57 (3.33%)	1.33±0.57 (6.67%)	5±2.64 (15%)	13±2.64 (75%)
100	0.67±0.57 (3.33%)	2.33±0.57 (11.67%)	17±0.0 (85%)		1.33±1.15 (6.67%)	2.67±3.05 (13.33%)	2.33±2.08 (11.67%)	12.33±3.78 (68.33%)	2±0.0 (10%)	5.33±3.05 (26.67%)	5.33±4.04 (26.67%)	6±6.55 (36.66%)	7.67±3.21 (40%)	4.67±3.51 (21.66%)	2.33±1.15 (11.66%)	5.33±6.11 (26.66%)
200	17.67±0.57 (88.33%)	2.33±0.57 (11.67%)			17±1.0 (85%)	1.67±0.57 (10%)	1.33±1.15 (6.67%)		17.33±0.0 (85%)	2.67±1.15 (13.33%)	0.33±0.57 (1.67%)		19±1.0 (95%)	1±1.0 (5%)		
400	19.33±1.15 (96,67%)	0.67±1.15 (3.33%)			19.33±1.15 (96,67%)	0.67±1.15 (3.33%)			20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)			

FAE (µg/mL)															
25	20±0.0 (100%)		20±0.0 (100%)		1.33±0.0 (6.67%)	0.67±1.15 (3.33%)	18±0.0 (90%)		1.0±1.0 (5%)	0.67±1.15 (3.33%)	18.33±0.57 (91.67%)		0.67±0.57 (3.33%)	6.67±2.51 (11.67%)	12±1.73 (85%)
50		8±1.73 (40%)	12±1.73 (60%)		1.67±1.52 (8.33%)	2.67±3.05 (13.33%)	15.33±3.78 (78.34%)		1.67±1.52 (8.33%)	2.67±3.05 (13.33%)	15.67±3.21 (78.34%)	2.67±2.51 (13.33%)	0.67±1.15 (3.33%)	4.67±2.08 (11.67%)	12±3.46 (71.67%)
100		6±1.0 (30%)	14±1.0 (70%)	1.33±2.30 (6.67%)	4.67±2.08 (23.33%)	1.67±1.52 (8.33%)	12.33±2.08 (61.67%)	3.33±5.77 (16.67%)	5.33±1.52 (26.67%)	3±1.0 (15%)	8.33±6.65 (41.66%)	8±3.60 (40%)	6±0.0 (30%)	1.33±0.57 (6.67%)	4.67±3.21 (23.33%)
200	17±2.64 (85%)	2.33±2.51 (11.67%)	0.67±1.15 (3.33%)	13±2.0 (65%)	5.33±2.08 (26.67%)	1±1.0 73(5%)	0.67±0.57 (3.33%)	14.33±2.08 (71.67%)	5.67±2.08 (28.33%)			16.67±4.16 (83.33%)	3.33±4.16 (16.67%)		
400	20±0.0 (100%)			20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)				20±0.0 (100%)			
F8-16 (µg/mL)															
25			20±0.0 (100%)		0.33±0.57 (1.67%)	0.33±0.57 (1.67%)	19.33±0.57 (96.66%)		0.67±0.57 (3.33%)	1.33±1.33 (6.67%)	18.0±1.0 (90%)		1.0±1.73 (5%)	4.0±2.0 (20%)	15±3.60 (75%)
50			20±0.0 (100%)		0.33±0.57 (1.67%)	0.33±0.57 (1.67%)	19.33±0.57 (96.66%)		1±1.73 (5%)	2.33±1.15 (11.67%)	16.67±2.51 (83.33%)		1.33±1.52 (6.67%)	4.67±2.88 (23.33%)	13.67±3.51 (68.34%)
100			20±0.0 (100%)	0.67±0.57 (3.33%)	1.0±1.0 (5%)	2.33±2.51 (11.67%)	16.0±1.73 (80%)	0.67±0.57 (3.33%)	1.67±1.52 (8.33%)	5.0±0.0 (25%)	12.67±1.15 (63.34%)	2.0±2.0 (10%)	1.67±1.52 (8.33%)	6.67±2.30 (33.33%)	10±1.0 (50%)
200			20±0.0 (100%)	1.67±1.15 (8.33%)	1.67±1.52 (8.33%)	14.33±0.57 (71.67%)	2.33±2.51 (11.67%)	4.33±0.57 (21.67%)	4.67±2.51 (23.33%)	7.0±2.64 (35%)	4.0±2.0 (20%)	12.33±1.52 (61.67%)	3.33±2.08 (16.67%)	2.67±0.57 (13.33%)	1.67±0.57 (8.33%)

400	20±0.0 (100%)	2.67±2.08 (11.67%)	17.67±1.52 (83.33%)		8.67±2.51 (43.33%)	10.67±3.51 (53.34%)	0.67±1.15 (3.33%)	17.0±2.0 (85%)	2.33±1.15 (11.67%)	0.67±1.15 (3.33%)

Ctrl Negat.= controle negativo. EB= extrato bruto; FAE= fração acetate de etila; F8-16= Fração rica em compostos fenólicos.Score 3 = Typical body movement and sucker in movement, adhering to the bottom or sides of the culture plate Score 2 = Reduced movement throughout the body and/or of anterior and posterior regions, absence of adhesion of the sucker. Score 0 = Absence of body movement.

Tabela 8- Resultados dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos ao extrato bruto da casca de *S. terebinthifolia* por 120 horas.

Grupos	Percentual de vermes (%) nos escores de motilidade após tempo de incubação																			
	24h				48h				72h				96h				120h			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Controle				100				100				100				100				100
PZQ 10 µM	100				100				100				100				100			
EB (µg/mL)																				
25				100				100				100				100			50.0	50.0
50				100				100				100				100			62,5	37.5
100				100				100				100			43.75	56.25			62.5	37.5
200			6.25	93.75			25	75			25	75		12.5	75	12.5	6.25	18.75	75	
400	6.25	31.25	56.25	6.25	6.25	62.5	25.0	6.25	6.25	62.5	31.25		50.0	37.5	62.5	62.5	56.25	25.0	18.75	

Grupos	Percentual de vermes (%) nos escores de motilidade após tempo de incubação																			
	24h				48h				72h				96h				120h			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Controle				100				100				100				100				100
PZQ 10 µM	100				100				100				100				100			
FAE (µg/mL)																				
25				100				100			56.25	43.75			56.25	43.75			75	25
50		93.75	25	75			37.5	62.5		12.5	75	12.5		37.5	56.25	6.25		50	50	
100		56.25	31.25	12.5		62.5	25	12.5		93.75	6.25			93.75	6.25		18.75	81.25		
200		93.75	6.25		6.25	93.75			12.5	87.5			31.25	68.75			100			
400	43.75	56.25			62.5	37.5			87.5	12.5			100				100			

Tabela 9- Resultados dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos à fração acetato de etila da casca de *Schinus terebinthifolia* por 120 horas.

103

Tabela 10- Resultados dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos à fração rica em compostos fenólicos (F 8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* por 120 horas.

Grupos	**Percentual de vermes (%) nos escores de motilidade após tempo de incubação**																			
	24h				**48h**				**72h**				**96h**				**120h**			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Controle				100				100				100				100				100
PZQ 10 µM	100				100				100				100				100			
F8-16 (µg/mL)																				
25				100				100			37.5	62.5			43.75	56.25		31.25	68.75	
50				100			18.75	81.25		6.25	37.5	56.25		31.25	43.75	25	12.5	37.5	50	
100			18.75	81.25			18.75	81.25		18.75	75	6.25		43.75	50	6.25	25	75		
200		6.25	37.5	56.25		31.25	43.75	25	43.75	43.75	12.5		56.25	43.75			100			
400		43.75	43.75	12.5	6.25	25	68.75		56.25	25	18.75		62.5	37.5			100			

Tabela 11- Resultados do desacasalamento dos vermes adultos expostos ao extrato bruto da casca de *Schinus terebinthifolia* e sua frações por 120 horas**.**

[µg/mL]	Tempo	EB	FAE	F8-16
		%	%	%
25	24	16,67	16,67	16,67
	48	25	16,67	16,67
	72	33,33	16,67	33,33
	96	41,67	25	33,33
	120	41,67	25	33,33
50	24	25	33,33	16,67
	48	25	33,33	33,33
	72	33,33	33,33	33,33
	96	50	50	33,33
	120	50	50	33,33
100	24	25	33,33	41,67
	48	25	50	58,33
	72	58,33	50	58,33
	96	66,67	50	66,67
	120	83,33	50	66,67
200	24	33,33	58,33	66,67
	48	83,33	91,67	75
	72	100	91,67	75
	96	100	100	100
	120	100	100	100
400	24	50	83,33	75
	48	83,33	100	100
	72	100	100	100
	96	100	100	100
	120	100	100	100

EB= extrato bruto; FAE= fração acetato de etila; F8-16= fração rica em composto

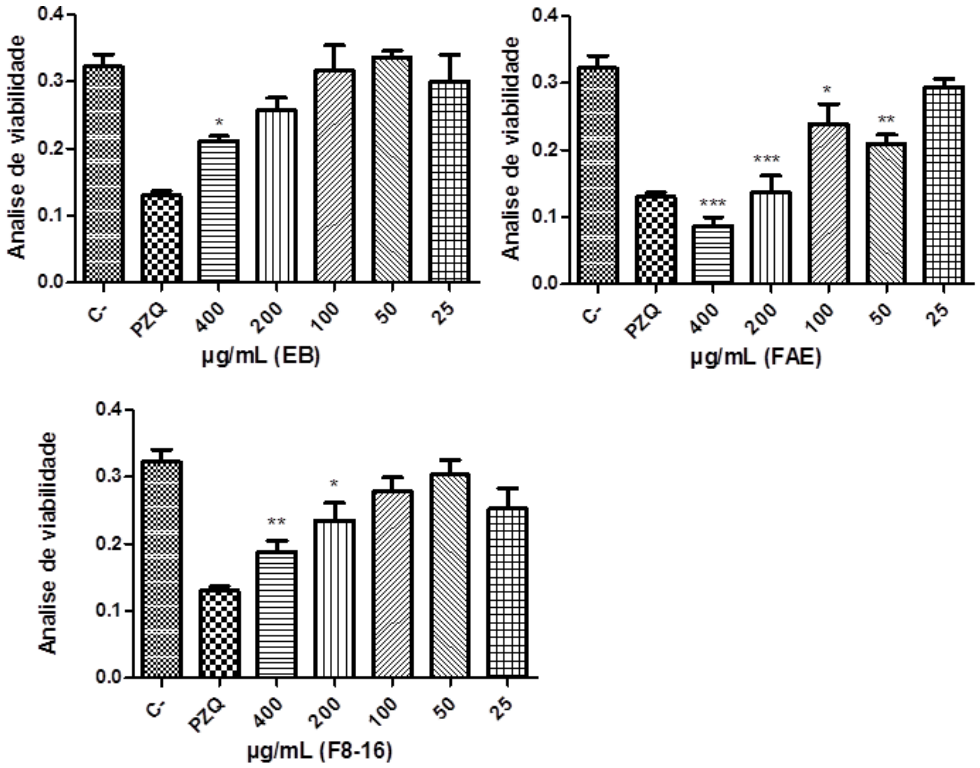


Figura 10- Resultados do efeito do EB, FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia* sobre viabilidade celular de vermes adultos de *S. mansoni*. *P<0.05; **P<0.01 e ***P<0.0001 comparação com grupo controle negativo.

Microscopia Eletrônica de Varredura dos vermes adulto, jovens e esquistossômulos de *schistosoma mansoni.*

Os esquistossômulos do grupo controle incubados por 24 horas no meio de cultura suplementada RPMI 1640 exibiram topografias e estruturas superficiais preservadas (fig. 2 a-c). Na fig. 2b ilustra a curvatura dorsal completa de esquistossômulo. A fig. 2a mostra região anterior com presença de espinhos. A fig. 2c mostra a região inferior do esquistossômulo com a presença da ventosa ventral. Após 24 horas de exposição na concentração de 200 µg/mL do EB da casca de *S. terebinthifolia* foi obsevada a presença de bolhas, sulco profundo e uma extensa área com orifícios e redução dos espiculas no tegumeto (fig. 3 a-c). Na concentração de 400 µg/mL do EB, foi observada uma extensa área de descamação e orificios, sulcos profundos e redução dos espinhos no tegumento (fig. 3 d-f). Após 24 horas de exposição na concentração de 200 µg/mL da FAE da casca de *S. terebinthifolia* foram obsevados as seguintes alterações: formação de bolhas, sulcos profundos, áreas com descamação e surgimento de orifícios no tegumento, além de encurtamento devido à contração muscular e redução de espiculas no tegumento (fig. 4 a-c). Para concentração de 400 µg/mL foram observadas alterações como área com inchaço, formação de bolhas, sulcos e sulcos profundos, surgimento de orifícios, redução de espiculas no tegumento e encurtamento de verme (Fig. 4 d-f). Em relação F8-16, na concentração de 200 µg/mL foram observado encurtamento do verme, formação de bolhas, descamação do tegumento, surgimento de orifício e redução de espicula no tegumento (Fig. 5 a-c). Na concentração de 400 µg/mL as alterações foram caracterizadas por perda total do tegumento com exposição de tecido subtegumentar, presença de bolhas, dobras coalescida e rompimento do tegumento, além de algumas áreas com inchaço (Fig. 5 d-f). O efeito do PZQ após 24 h de incubação causou alterações no tegumento como erosão do tegumento (ET), sulcos profundos (SP), descamação (D) e formação de bolhas (B). (Fig. 6 a-c).

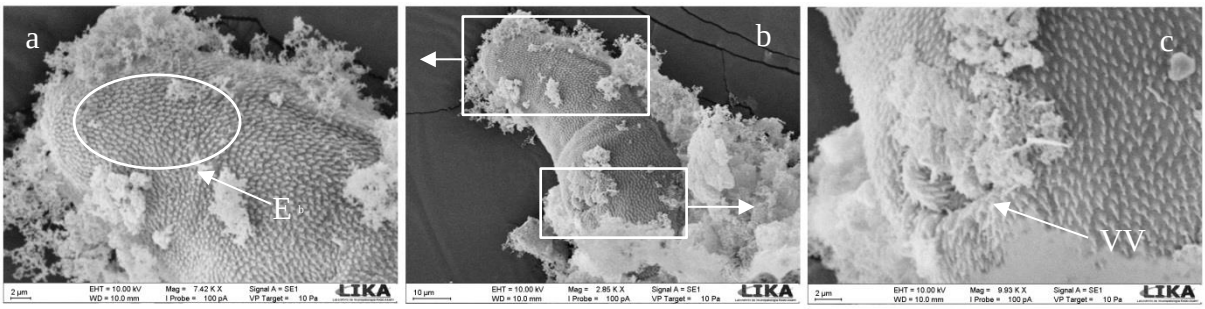


Figura 11- MEV imagem do esquistossomulo do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementada por 24 horas; (b, 2.85 kx) a curvatura dorsal mostra a estrutura da superfície intacta e a topografia morfológica normal; (a, 1.88 kx) a imagem ampliada mostra a região anterior com presença de espinhos (E) (c, 9.93 kx) a imagem ampliada mostra região inferior com presença de ventosa ventral (VV).

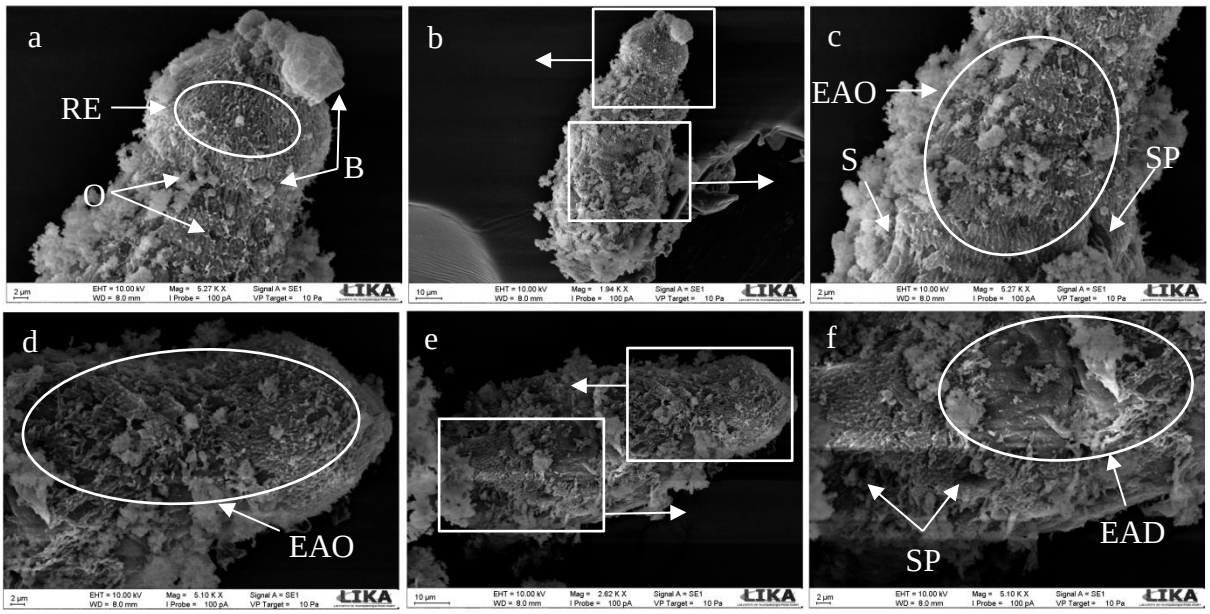


Figura 12- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao EB nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 1.94; 2.62 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 5.27 kx) a imagem ampliada mostra área com orifícios (O), bolhas (B) e redução de espinhos (RE); (c, 5.27 kx) a imagem ampliada mostra uma extensa área com orificios (EAO); (d, 5.10 kx) mostra a presença de sulco (S) e sulco profundo (SP); (f, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma extensa área de descamação (EAD) e sulcos profundos (SP).

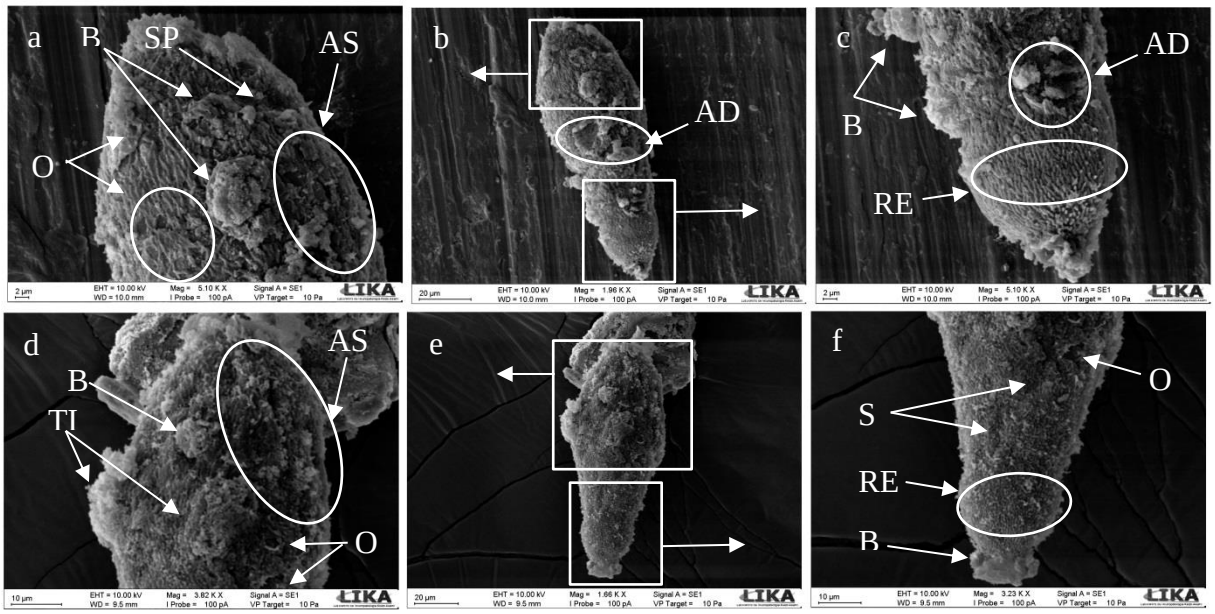


Figura 13- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto a FAE nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 1.96; 1.66 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra área com orifícios (O), bolhas (B), área com sulco (AS) e sulco profundo (SP); (c, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma área com redução de espicula (RE), área com descamação (AD) e presença de bolhas; (d, 5.10 kx) mostra área com sulcos (AS), presença de bolhas, orificios e tegumento inchado (TI); (f, 5.10 kx) a imagem ampliada mostra uma área com redução de espicula (RE), presença de bolhas (B), sulcos (s) e orificios (O).

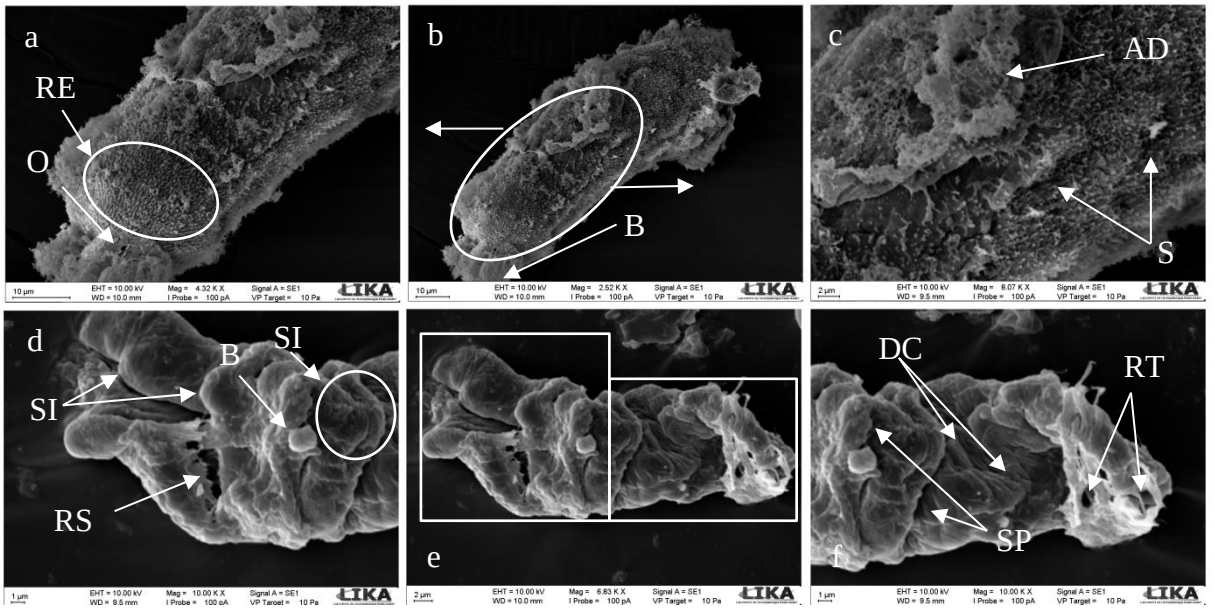


Figura 14- (a-f). MEV imagem do esquistossomulo exposto a F8-16 nas concentrações de 200 e 400 µg/mL por 24 horas; (b; e, 2.52; 6.83 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 4.32 kx) a imagem ampliada mostra presença de orifício (O), bolhas (B) e área com redução de espiculas (RE); (c, 8.07 kx) a imagem ampliada mostra uma área com descamação (AD) e presença de sulcos (S); (d, 10.00 kx) mostra a presença de subtegumento inchado (SI), bolha (B) e rompimento do subtegumento (RS); (f, 10.00 kx) a imagem ampliada mostra sulcos profundos (SP), sugimento de dobras coalescidas (DC) e rompimento de sutegumento (RS).

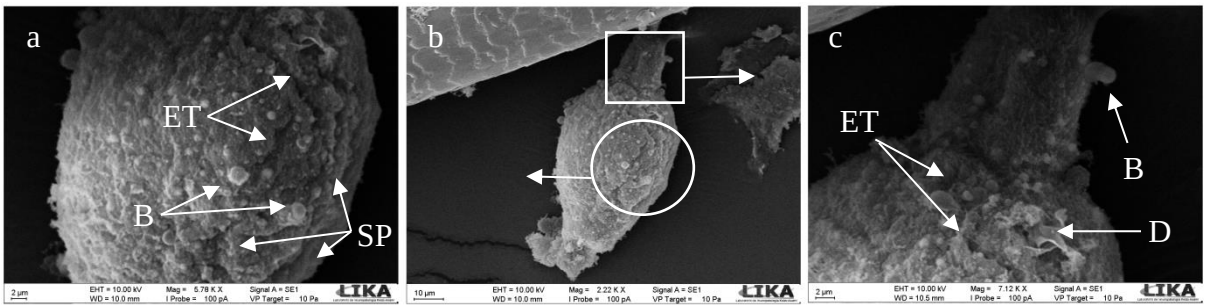


Figura 15- (a-c). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao controle positivo (PZQ) na concentração de 10 µM por 24 horas; (b; e, 2.52; 6.83 kx) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento; (a, 4.32 kx) a imagem ampliada mostra presença de orifício (O), bolhas (B) e área com redução de espiculas (RE); (c, 8.07 kx) a imagem ampliada mostra uma área com descamação (AD) e presença de sulcos (S); (d, 10.00 kx) mostra a presença de subtegumento inchado (SI), bolha (B) e rompimento do subtegumento (RS); (f, 10.00 kx) a imagem ampliada mostra sulcos profundos (SP), sugimento de dobras coalescidas (DC) e rompimento de sutegumento (RS).

Os vermes jovens do grupo controle negativo apresentaram topografia corporal e aspectos ultraestruturais com parâmetros morfológicos normais, assim como demonstrado na Figura 7 (a-c). Ainda na região anterior é possível observar as ventosas ventral (VV) e oral (VO) do parasito (Fig. 7 a-c). Os vermes jovens expostos ao EB de *S. terebinthifolia* e suas frações apresentaram alterações significativas no tegumento. Após 24 horas de exposição, o EB na concentração de 200 µg/mL causou alteração no tegumento dos vermes e foi possível observar áreas com lesão focal (LF), formação de bolhas (B), áreas com sulcos profundos (SP) e aparecimento de orifícios no tegumento (O) (Fig. 8 a-f). E para concentração de 400 µg/mL foi possível observar uma contração dorsoventral (CD), sulcos profundos (SP), descamação do tegumento (D) e erosão (E) na região da ventosa oral (Fig 9 a- f).

Em relação a FAE, após 24 horas de exposição à concentração de 200 µg/mL, causou alterações no tegumento de vermes jovens como formação de bolhas (B), orifícios (O), sulcos profundos (SP) e descamação (D) (Fig. 10 a-f). Enquanto que na concentração de 400 µg/mL foram observadas alterações como contração muscular (CM), lesões focais (LF), dobras coalescidas (DC), orifícios (O) e descamação no tegumento (D) e formação de bolha (B) (Fig. 11 a-f). Para a F8-16, a concentração de 200 µg/mL causou alterações como sulcos profundos e extensa área com orifícios (EAO), descamação (D), erosão do tegumento (ET) com exposição de tecido subtegumentar, além de formação de bolhas (B) e orifícios (O) (Fig. 12 a-f). Na concentração de 400 µg/mL foram observadas alterações como contração muscular (CM), formação de bolhas (B), erosão (E) na região da ventosa oral, descamação (D), orifícios (O), sulco profundo (S) e extensa área com retração do tegumento (RT) (Fig. 13 a-f). O efeito do

PZQ após 24 h de incubação foi marcado por alterações no tegumento como erosão do tegumento (ET) e formação de bolhas (B). (Fig. 14 a-c).

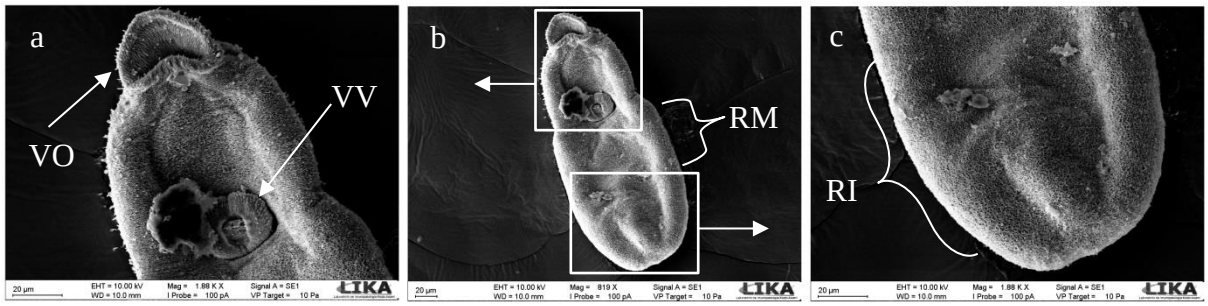


Figura 16- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementada por 24 horas; (b, 819 x) região médiana do verme mostra a estrutura superficial intacta (RM); (a, 1.88 kx) em uma imagem ampliada da região anterior mostra a ventosa oral e ventral (VO; VV); (c, 1.88 kx) em uma imagem ampliada mostra região inferior sem alteração (RI).

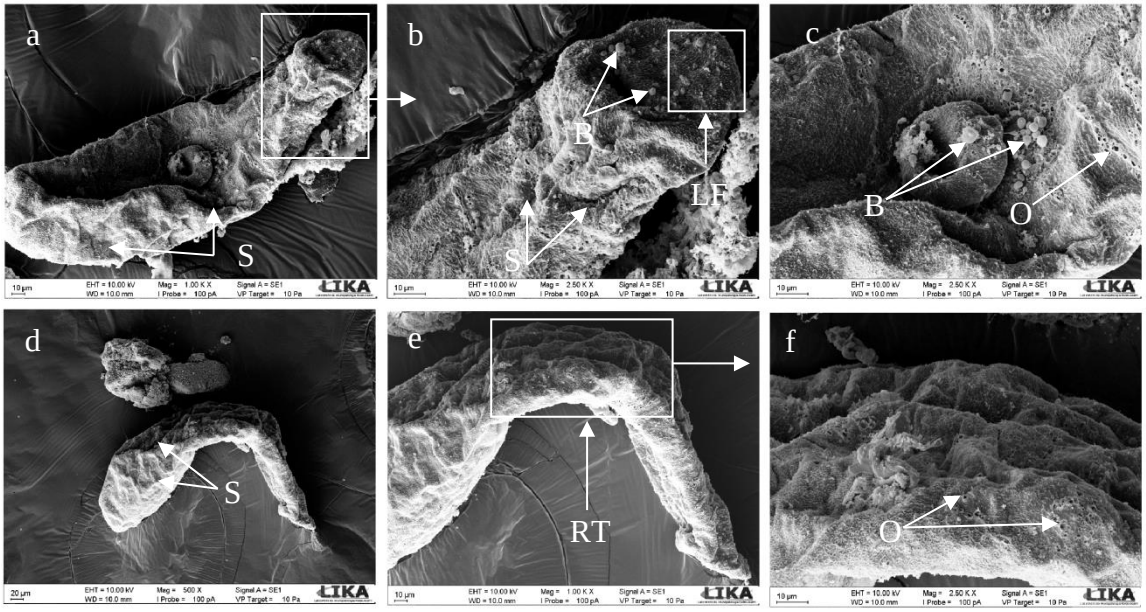


Figura 17- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da EB da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 1.00kx) mostra à curvatura dorsoventral com sulcos profundo (SP) (b, 2.50kx) a parte anterior à ventosa oral mostra o tegumento com lesão focal (LF), bolhas (B) e sulcos profundos (c, 2.50kx) em imagem aumentada, região anterior a ventosa ventral mostra formação das bolhas (B) e orifícios no tegumento (O) (d, 500x), a região inferior mostra os solcos (S) na parte posterios e dorsal (f, 2.50kx) em uma imagem ampliada mostraextensa área com corrugação no tegumento (EAC) e orificio (O).

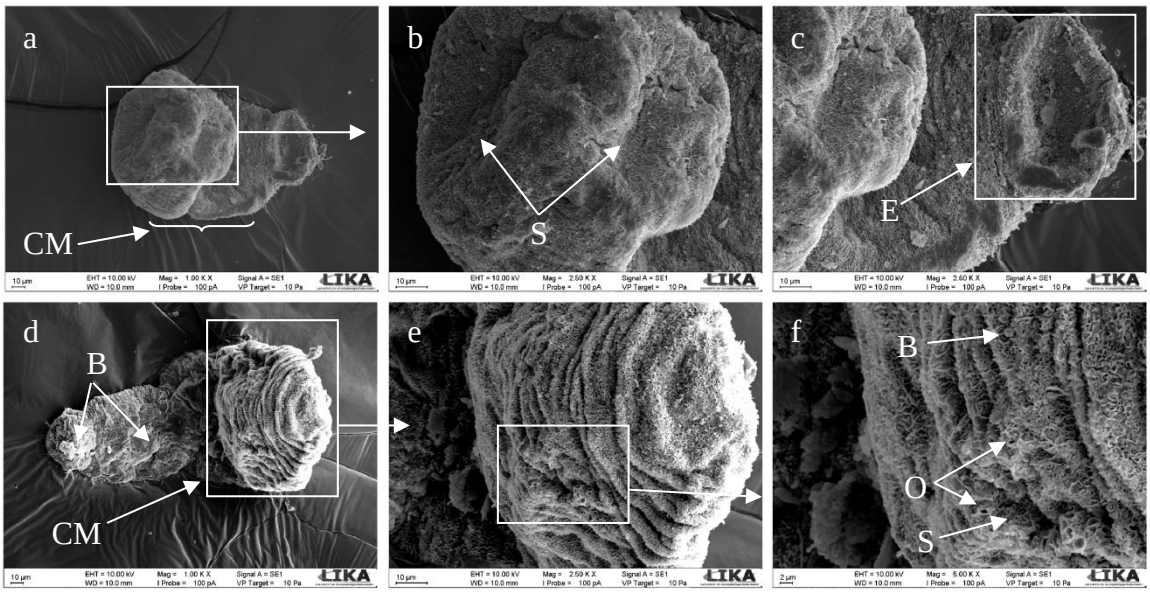


Figura 18- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da EB da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 1.00kx) mostra à curvatura dorsoventral com contração muscular (MC) (b, 2.50kx) em imagem aumentada região inferior mostra sulcos profundos na parte posterior (SP), (c, 2.50kx) região anterior do tegumento mostra erosão ao redor da ventosa oral (E) (d, 1.00kx), a região inferior mostra a contração muscular (CM) e formação de bolhas (B) (f, 5.00 kv) em uma imagem ampliada mostra sulco profundo (SP), orifícios (O) e bolhas (BR).

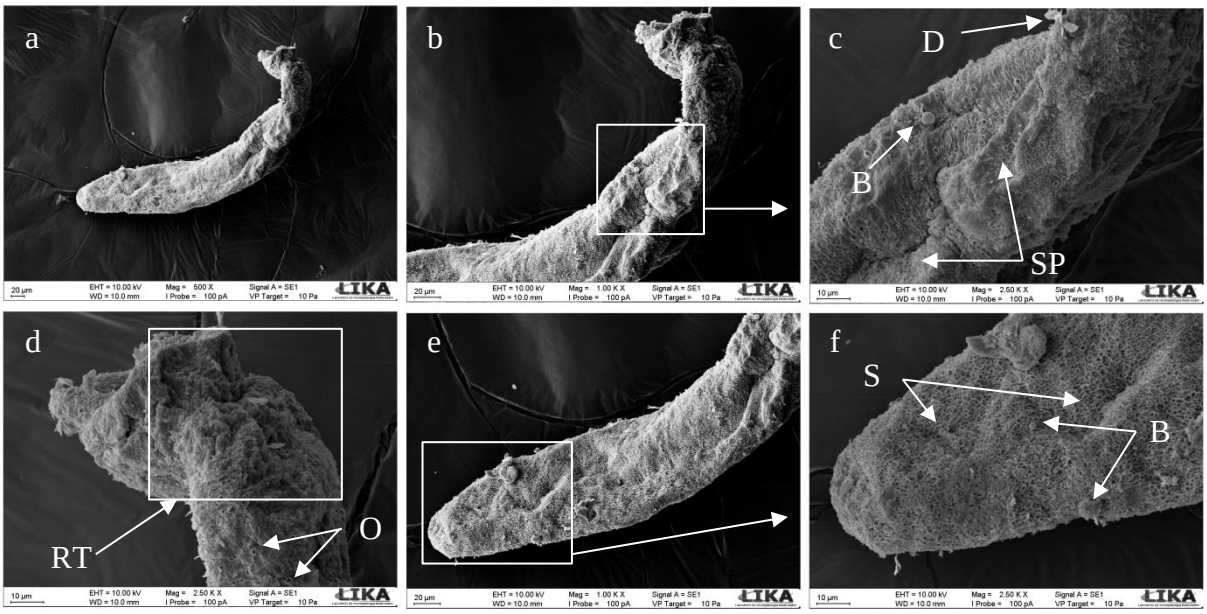


Figura 19- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da FAE da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 500x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 1.00kx) em uma imagem ampliada, a parte anterior do verme mostra o tegumento com sulcos profundos (SP), formação de bolhas (B) e descamação (D). (d, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região posterior do verme mostra uma extensa área de retração do tegumento (RT) e orifícios (O). (f, 5.00kx) em imagem ampliada, a parte inferior mostra a tegumento com sulcos (S), formação de bolha (B).

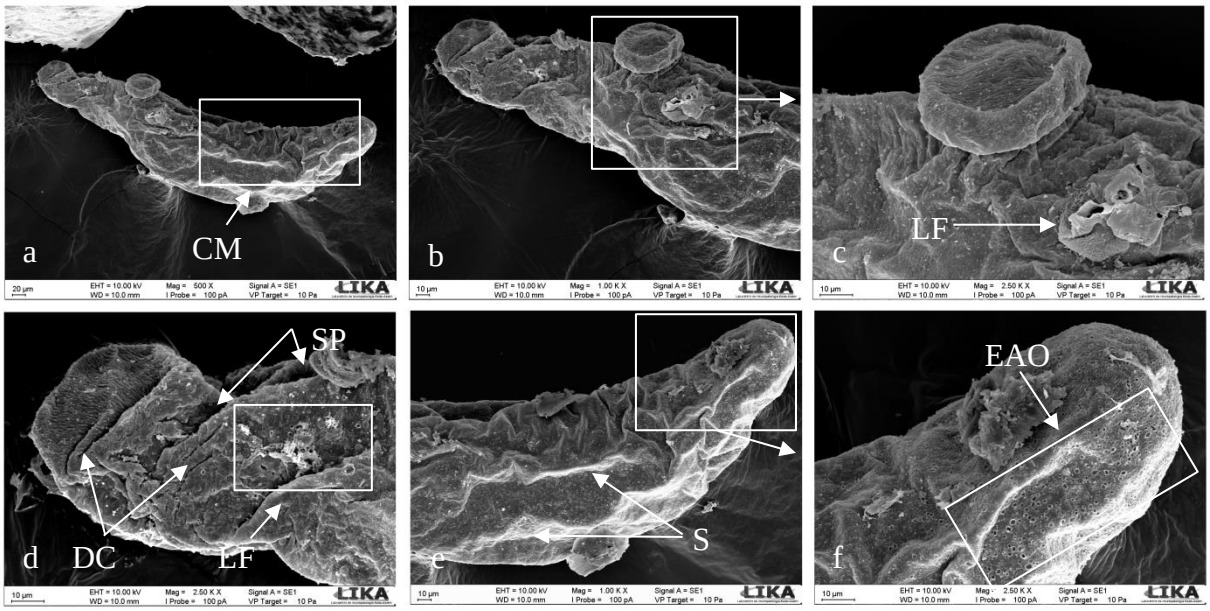


Figura 20- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da FAE da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 500x) mostra à curvatura dorsoventral com contração muscular (CM). (c, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região anterior à ventosa ventral mostra o tegumento com lesão focal (LF), (d, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região próxima a ventosa oral mostra tegumento com dobras coalescidas (DC), lesão focal (LF) e sulcos profundos (SP). (e, 1.00kx) em imagem ampliada, a região dorsal mostra tegumento com sulcos (S) (f, 2.50kx) em uma imagem ampliada mostra uma extensa área do tegumento com orificios (EAO).

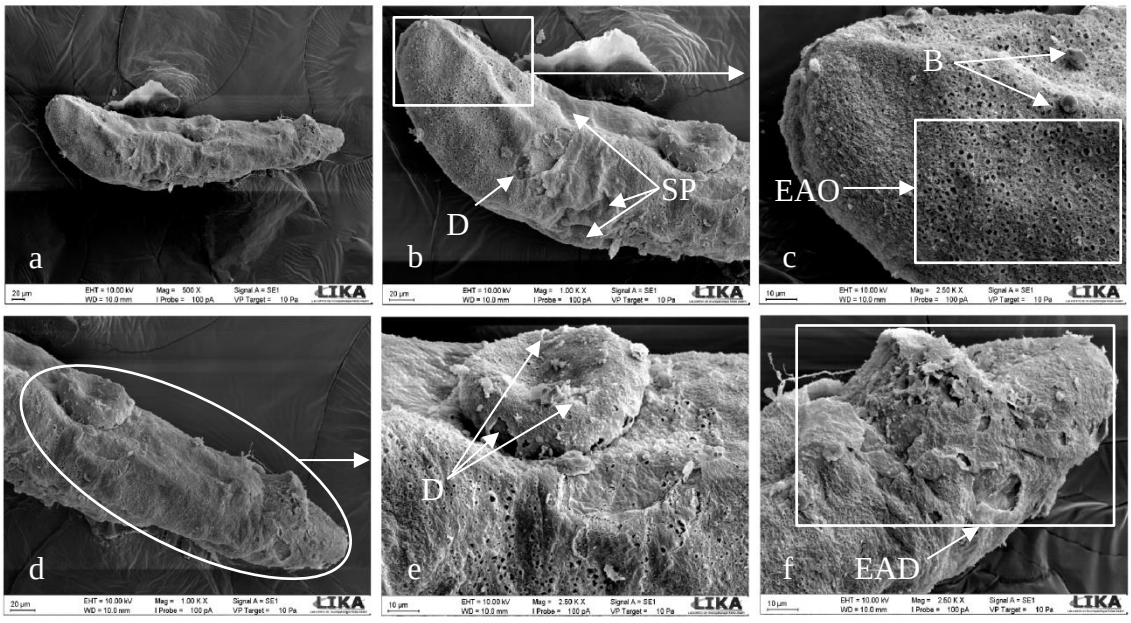


Figura 21- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da F8-16 da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 500 x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 1.00 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal do verme, mostra o tegumento com descamação (D) e sulcos profundos (SP), (c, 2.50kx) em uma imagem ampliada, região dorsal do verme mostra formação da bolha (B) e uma extensa área do tegumento com orificios (EAO) (e, 5.00 kx) em imagem aumentada, a região anterior do verme no a ventosa ventral, mostra a descamação de tegumento (D) (f, 2.50 kv) em uma imagem ampliada, região próxima a ventosa oral mostra uma extensa área do tegumento com descamação (EAD).

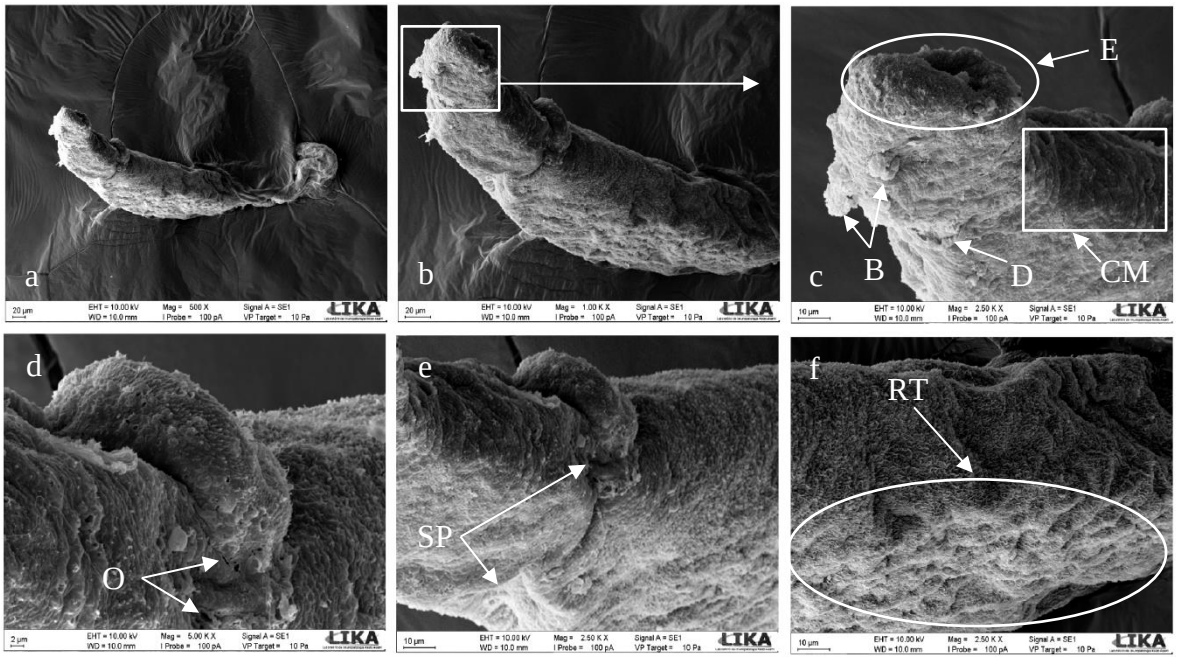


Figura 22- (a-f). MEV imagem do verme jovem de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da F8-16 da casca *S. terebinthifolia* por 24 horas. (a, 100x) mostra à curvatura dorsoventral (c, 5.00 kx) em uma imagem ampliada, mostra erosão ao redor da ventosa oral (E) na parte posterior à ventosa oral mostra a formação da das bolhas (B), e na região anterior do verme, mostra contração muscular (CM). (d, 5.00 kx) em uma imagem ampliada, região dorsal mostra formação da bolha (B) e tegumento com orificios (O). (e, 2.50 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal mostra tegumento com sulcos profundos (SP) (f, 2.50 kx) em uma imagem ampliada, uma extensa área com retração do tegumento (RT).

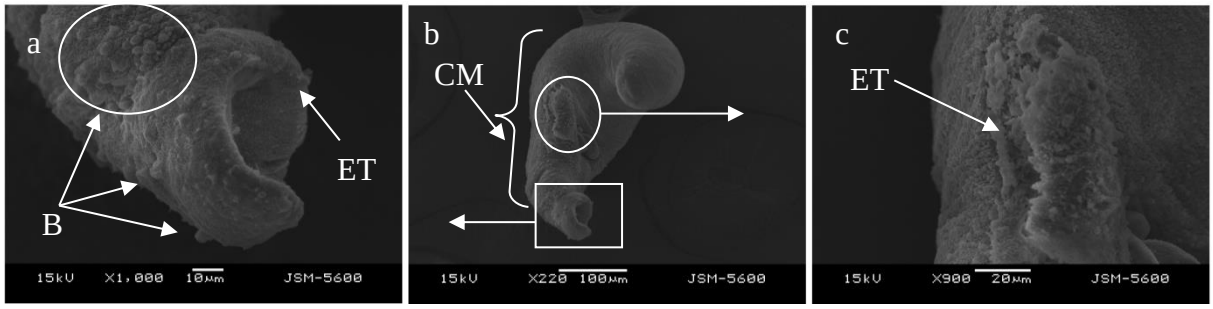


Figura 23- (a-c). MEV imagem do esquistossomulo exposto ao controle positivo (PZQ) na concentração de 10 µM por 24 horas; (b, 220 x) mostra esquistossômulos completo com danos no tegumento e contração muscular (CM); (a, 1000 x) a imagem ampliada mostra presença de bolhas (B), e erosão do tegumento ao redor da ventosa oral (ET); (c, 900 x) a imagem ampliada mostra uma área com erosão do tegumento (ET).

Na figura 15 a-c, são demonstrados os vermes incubados por 120 horas em meio PPMI 1640 suplementado que corresponde o grupo controle negativo. As imagens mostraram a topografia corporal e aspectos ultraestruturais com parâmetros morfológicos normais. Na imagem (Fig. 15a), pode ser observado um verme macho exibindo sua curvatura ventrolateral com canal ginecóforo (CG) evidenciado, que corresponde a uma dobra longitudinal que serve para albergar a fêmea com o objetivo de acasalamento e reprodução. Na parte anterior do verme

macho, pode ser observada ventosa oral, ventral e tegumento com inúmeros tubérculos (Fig. 15b). Em uma imagem aumentada da parte médio dorsal foi observado vários tubérculos com espículas típicas, ademais, também foram observadas papilas ciliadas, papilas com aspecto de cúpula e dobras tegumentares dispostas em paralelo (Fig. 15c).

As mudanças na ultraestrutura dos vermes adultos de *S. mansoni* causadas por EB da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações nas concentrações de 200 e 400 µg/mL após 120 horas de exposição são apresentadas nas Figs. 16/17a-f, 18/19a-f e 20/21a-f, respectivamente. Para EB, na concentração de 200 µg/mL foi observada lesão focal no tegumento (LF) na ventosa oral e descamação no tegumento, e na região dorsal do tegumento foram observadas as seguintes alterações: formação de bolhas (B), danos nas dobras tegumentares (Dt), tubérculos com redução de espículas (DT) e sulco (Fig. 16b; e; f). Enquanto que, na concentração de 400 µg/mL as alterações foram mais severas, portanto, foi observada na região anterior do verme erosão no tegumento ao redor da ventosa oral (ET), lesão focal (LF), perda de tubérculos (Pt), descamação (D), redução de tubérculo (RT) e com aparecimento de dobras coalescidas (DC), formação de bolhas (B), algumas rompidas (BR), danos nos tubérculos (Et) com redução das espículas (RE) na região dorsal do tegumento de verme (Fig. 17b; c; e; f).

A FAE na concentração de 200 µg/mL causou alterações nítidas sobre a musculatura dos vermes, causando intensa contração na região dorsoventral (Fig. 18). Os efeitos da FAE foram mais acentuados na concentração de 400 µg /mL (Fig. 19). Na concentração de 200 µg/mL foram observadas alterações como danos nos tubérculos (DT) com exposição do tecido subtegumentar, redução das espículas (RE) e formação de bolhas (B), bolhas rompidas (BR) e formação de orifícios na região dorsolateral do tegumento de verme (Fig 18 b-f). Na concentração de 400 µg /mL foram observadas alterações significativas no tegumento do verme, como formação de bolhas (B) e bolhas rompidas (BR), com surgimento de dobras coalescidas (DC) na parte dorsal, lesões focais e descamação na região posterior da ventosa oral, erosão de tubérculos (ET) com a exposição de tecido subtegumentar, redução das espículas (RE) e sulcos na região dorsolateral (Fig. 19 a-f).

Na fração F8-16, os vermes incubados na concentração de 200 µg/mL sofreram danos notáveis no tegumento, sendo possível observar danos nos tubérculos (DT) com redução das espiculas e danos nas dobras tegumentares (Dt) e formação de bolha (B) na região dorsal próximo da ventosa ventral, e na região inferior do verme (Fig. 20 b- f). Para concentração de 400 µg/mL, foi observada lesão focal (LF) no tegumento na parte posterior da ventosa ventral,

formação de bolhas(B), danos nos tubérculos (DT) e redução de espículas (RE) e danos nas dobras tegumentares (Dt) e porosidade no tegumento (Fig. 21 b-f). Após 120 horas de exposição, foi observado o encurtamento dos vermes adultos expostos a PZQ 10 µM, devido à contração muscular (CM) provocada por essa droga. O efeito do PZQ após 120 h de incubação foi marcado pela presença de tubérculos erodidos (ET) com a perda de espículas (PE) e exposição do tecido subtegumentar, dobras tegumentares lisas (DTL) e sulcos (S) no tegumento. (Fig. 22 a-c).

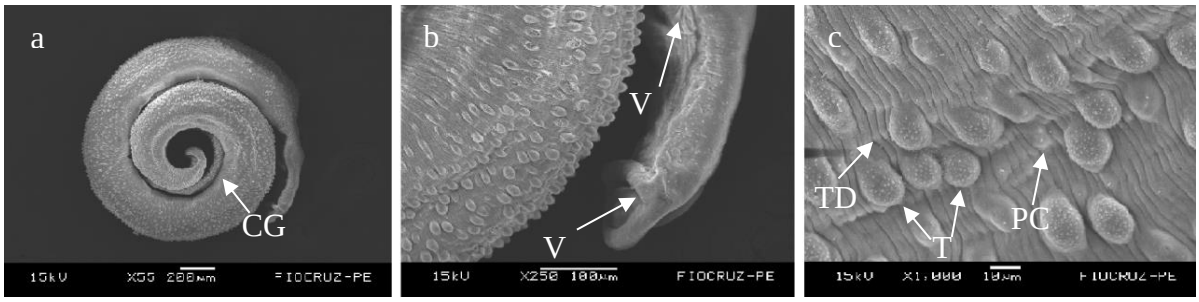


Figura 24- (a-c). MEV images do tegumento do verme adulto de *S. mansoni* do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de cultura suplementado com RPMI por 120 horas; (a, 55x) mostra canal ginecóforo (CG); (b, 250x) a parte anterior mostra as ventosas oral e ventral (VO; VV); (c, 1000x) a região dorsal ilusta os tubérculos (T), papilas ciliadas (Pc), papilas em forma de cúpula (PC), tegumento com dobras paralelas arranjadas (TD).

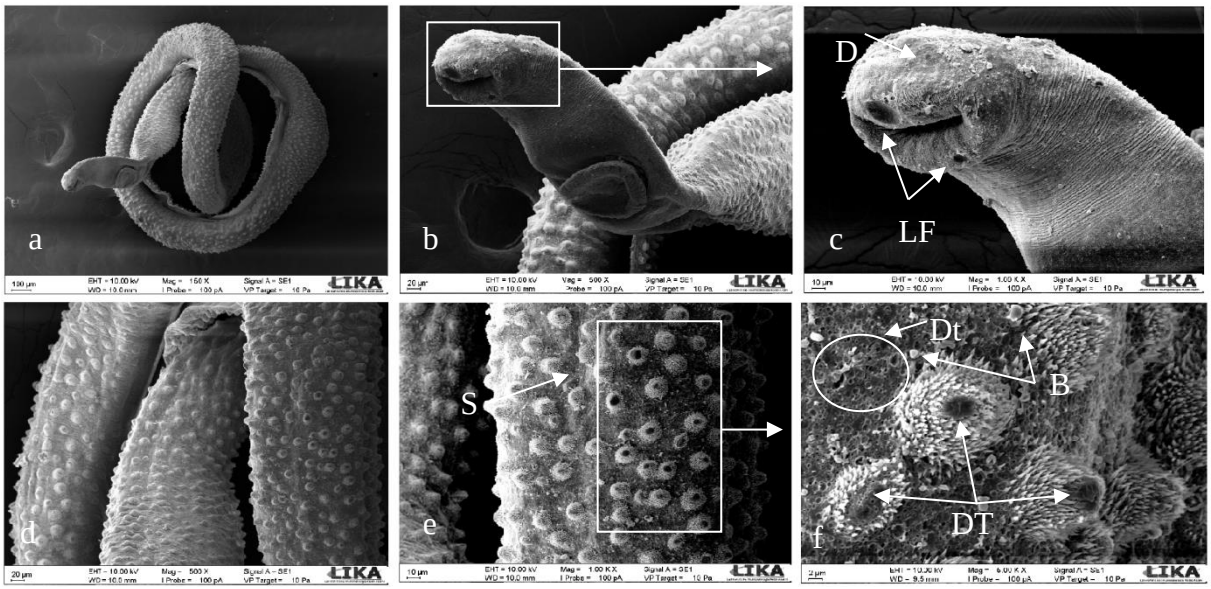


Figura 25- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL do EB da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 150 x) mostra à curvatura dorsoventral. (b, 500 x) mostra a região anterior do verme com ventosa oral e ventral. (c, 1.00 kx) em uma imagem aumentada mostra lesões focais na ventosa oral e descamação (LF) (d, 500 x) mostra a curvatura dorsolateral. (e, 1.00 kx) mostra a região dorsal com sulco (S). (f, 5.00 kx) em maior aumento a parte dorsal mostra o tegumento com danos nos tubérculos (DT) com redução de espicula, formação de bolhas (B) e danos nas dobras tegumentares (Dt).

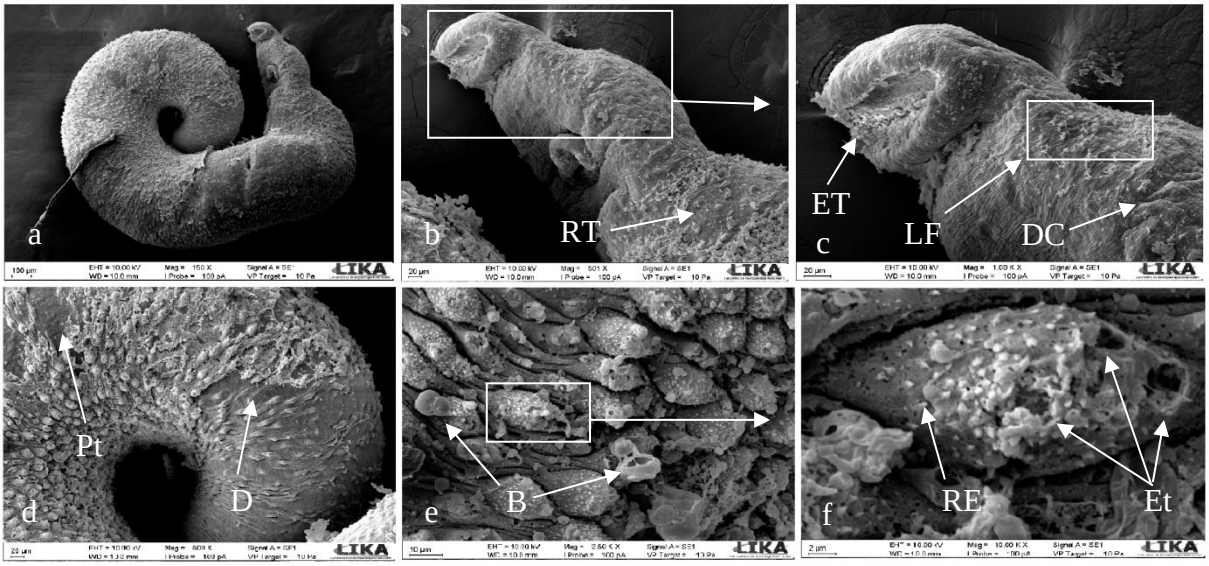


Figura 26- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL do EB da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 150 x) mostra à curvatura dorsoventral. (c, 1.00 kx) em uma imagem aumentada mostra lesões focais (LF) na região dorsal próximo à ventosa oral, erosão no tegumento da ventosa oral (ET) e dobra coalescida (DC). (d, 500 x) em uma imagem ampliada ilustra a região dorsolateral com descamação (D) e perda dos tubérculos (Pt). (f, 1000 x) em maior aumento a parte dorsal mostra erosão do tubérculo (Et) com redução de espícula (RE) e formação de bolhas (B).

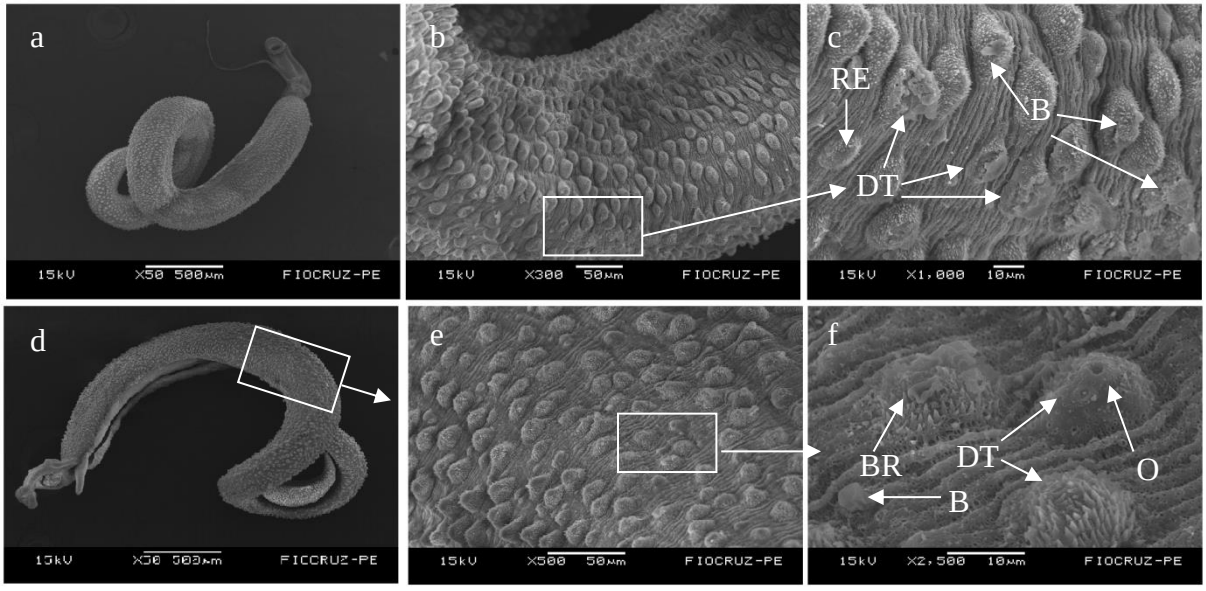


Figura 27- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da FAE da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 50x) mostra à curvatura dorsolateral do verme (c, 1000x) em maior aumento da região dorsal, é exibido o tegumento com danos tubérculos (DT) com redução de espículas (RE) e bolhas (B), (d, 50 x) mostra a curvatura dorsoventral com danos no tegumento (f, 15 kv) mostra a formação de orifício, bolhas (B) e bolhas rompida (BR).

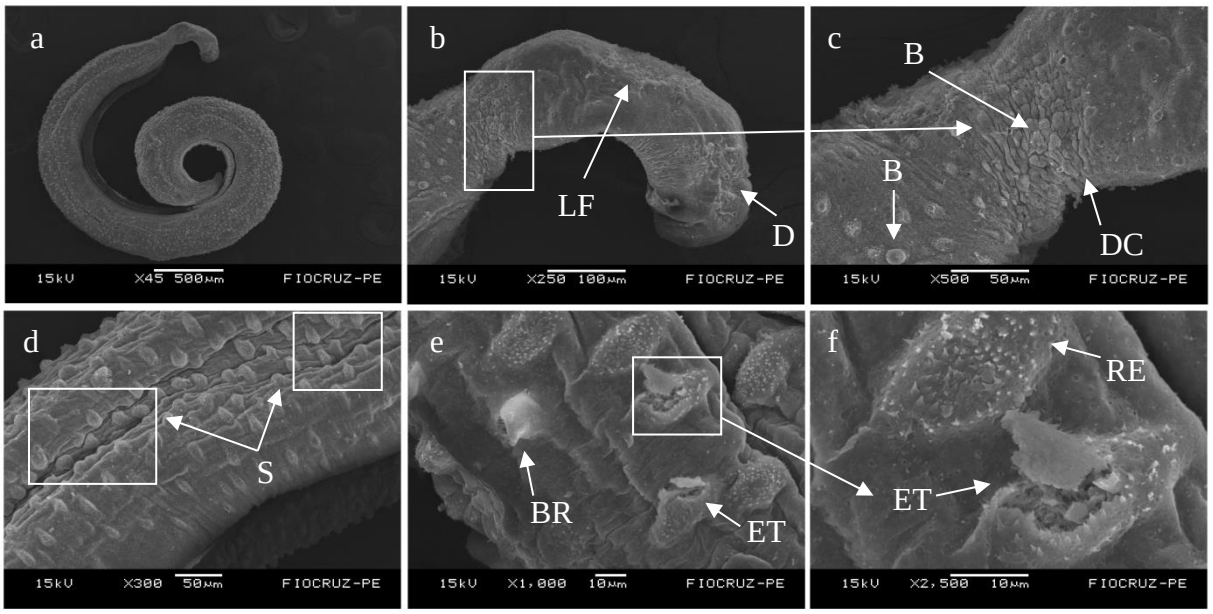


Figura 28- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da FAE da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 45x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 250x) a parte posterior à ventosa oral mostra o tegumento com lesões focais (LF) e descamação (D) (c, 500x) em imagem ampliada mostra formação das bolhas (B) e dobras coalescidas (DC), (d, 300 x) em uma imagem ampliada ilustra a região dorsolateral com sulcos, (e, 1000x) em imagem aumentada, a região dorsal mostra a bolha rompida (BR), erosão do tubérculo (ET) e redução de espículas (RE).

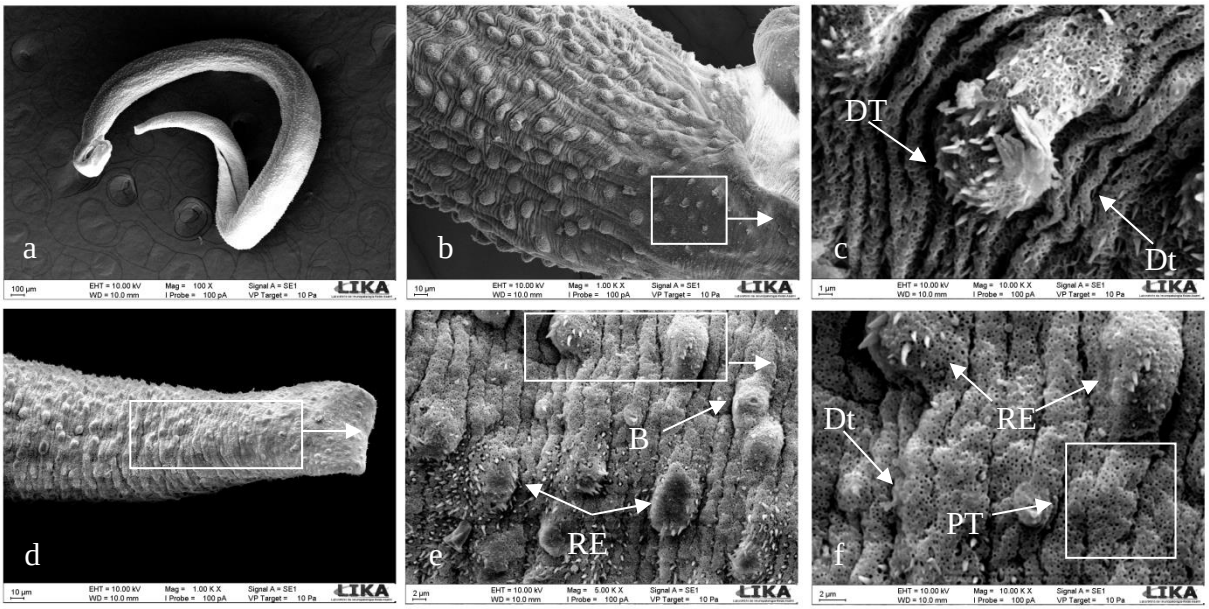


Figura 29- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 200 µg/mL da F8-16 da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 100x) mostra à curvatura dorsoventral (b, 10.00kx) mostra a região dorsolateral com lesão no tegumento. (c, 10.00kv) a parte dorsal próxima à ventosa ventral mostra danos no tubérculo (DT) e redução de espículas (RE). (d, 1.00 kx) mostra lesão na região dorsal e inferior do verme (e, 5.00kx) em região inferior do verme, mostra a formação bolha no tegumento (B) e redução das espículas (RE). (f, 5.00 kx) em uma imagem ampliada mostra redução de espiculas (RE), danos nas dobras tegumentares (Dt) e porosidade no tegumento (PT).

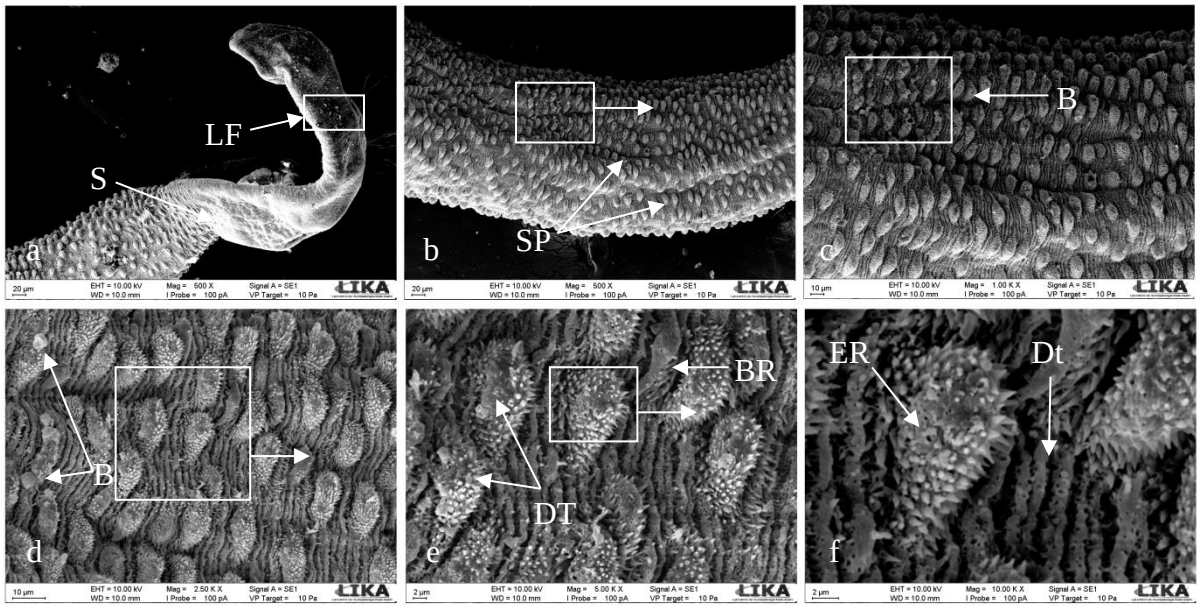


Figura 30- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à concentração 400 µg/mL da F8-16 da casca *S. terebinthifolia* por 120 horas. (a, 500 x) mostra lesão focal (LF) e sulcos (S) na região posterior da ventosa oral e ventral (b, 500x) a região dorsolateral do verme mostra o tegumento com sulcos profundos (SP). (c, 1.00 kx) em uma imagem ampliada mostra formação de bolhas (d, 2.50 kx) região dorsolateral mostra formação das bolhas (B). (e, 5.00 kx) em imagem aumentada, a região dorsal mostra a bolha rompida (BR) e danos nos tubérculos (DT) (f, 10.00 kx) em uma imagem ampliada mostra danos na dobra tegumentares (Dt) e redução das espiculas (RE).

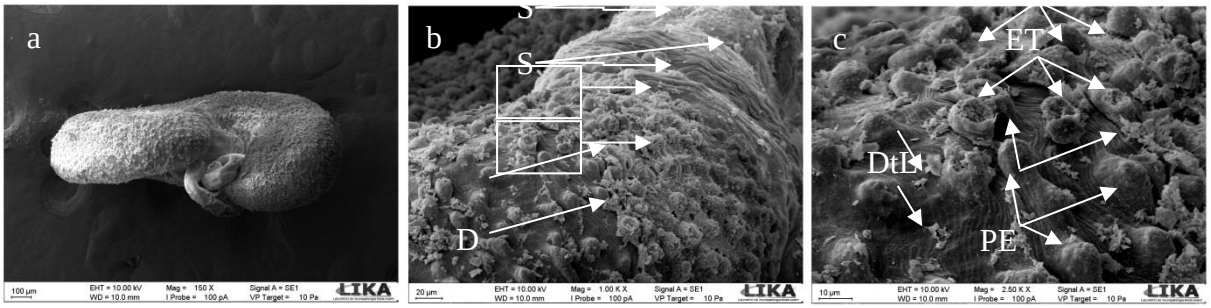


Figura 31- (a-f). MEV imagem do verme adulto de *S. mansoni* exposto à PZQ 10 µM por 120 horas. (a, 100 x) mostra à curvatura dorsal (b, 1.00 kx) em uma imagem ampliada, a região dorsal do verme mostra descamação do tegumento (D) e sulcos (c, 2.50 kx) em imagem aumentada, a região dorsal mostra dobra tegumentar lisa (DtL), erosão dos tubérculos (ET) e perda de espículas (PE).

Discussão

Para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de extratos vegetais, é de grande relevância uma pesquisa detalhada do perfil fitoquímico da planta em estudo. No presente estudo a prospecção fitoquímico dos extratos de *S. terebinthifolia* revelaram a presença de metabolitos secundários, como taninos, saponinas, terpenoides, esteroides, flavonoides e açucares. Na literatura há relatos de que os terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos e seus

derivados possuem varias atividades biológicas, dentre as quais atividade esquistossomicida (Moraes, 2015). Portanto, estudos mostram que alguns terpenoides possuem ação sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, além de provocar a separação completa dos casais (Moraes, 2015). E com relação aos flavonoides, não causam mortalidade aos vermes adultos de *S. mansoni*, porém apresentam redução significativa na motilidade dos vermes e causam desacasalamentos (Neves et al., 2015). Estudo realizado com as amostras de *S. terebinthifolia* quanto ao seu potencial moluscicida (dados não publicados) foi possível identificar a presença de flavonoides terpenoides através do CCD e acido gálico e catequinas pelo HPLH, e os efeitos biológicos como perda da motilidade, desacalamento e lesões significativas no tegumeto dos vermes provocados por essas amostras podem estar relacionados a esses compostos ou por uma ação sinérgica com vários outros compostos contidos nas amostras.

Para o controle e combate a esquistossomose a OMS recomenda o uso de Praziquantel para o tratamento de pessoas infectadas, devido a sua ação sobre todas as espécies do gênero *Schistosoma*. Embora o PZQ tenha apresentado uma elevada ação terapêutica e eficácia, o que leva a diminuição da morbidade das pessoas, os relatos na literatura tem reportado que essa droga possui ação menos eficaz sobre as formas jovens dos vermes (MORAES, 2011; TLAMÇANI; ER- RAMI, 2014; NEVES, 2016; MENDES, 2019). Portanto, a procura e descoberta de novos compostos exigem ação esquistossomicida, em todas as formas evolutivas do *Schistosoma*. Neste trabalho atividade do PZQ foi testada na forma jovem do verme e esquistossomulo de *Schistosoma*. Foi observado que não houve mortalidade após 120 horas de incubação. No entanto, os resultados após a exposição com EB, FAE e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram atividade efetiva sobre as duas fases do verme de *S. mansoni* expostos às concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL após 120 horas de incubação (Tabela 3-7), causando alterações na motilidade, redução da viabilidade celular do verme e danos significativos no tegumento e morte.

Entretanto, de acordo com relatos na literatura, para avaliar os efeitos do medicamento sobre os vermes de *S. mansoni*, o tegumento constitui o principal alvo para atuação da droga, devido a sua função de proteger os órgãos vitais, absorção de nutrientes, metabolização de lipídios e colesterol, proliferação e reparo de tecidos e absorção seletiva de medicamentos (Krautz Peterson et al., 2007; Faghiri; Skelly, 2009; Pereira et al., 2011; Lima et al., 2014). Portanto, após analise da ultraestrutura as imagens mostraram uma alta suceptibilidade dos vermes em diferentes fases evolutiva (esquistossômulos, verme jovem e adulto de *S. mansoni*),

principalmente em altas concentrações, 200 e 400 µg/mL após 120 horas de incubação foi observada, devido às mudanças na atividade motora (retração do tegumento e contração muscular) e intensa e extensa destruição do tegumento, como formaão de bolha, erosão do tegumento e tubérculos, redução de espiculas, descamação e surgimento de orificios. Essas alterações contribuem para explicar os efeitos e possível mecanismo de ação das amostras de *S. terebinthifolia*. Portanto estudos com acido barbatico e sal de potássio de acido usnico também demostraram efeitos similares (Araújo et al., 2020; Silva et al., 2020), o que corabora com nosso estudo.

Nos últimos anos, há vários relatos de plantas medicinais quanto aos seus potenciais esquistossomicida. E a Organização Mundial da Saúde tem incentivado estudos com plantas medicinais tradicionalmente conhecidas para o desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente para as enfermidades que atingem países em desenvolvimento (Oliveira et al., 2014). Estudos com extratos da casca e raiz de *Rauwolfia vomitoria* demostraram uma boa atividade esquistossomicida frente aos vermes adultos de *S. mansoni*, onde todos os vermes expostos às concentrações de 250-1000 µg/mL apresentaram 100% de mortalidade após 120 horas de exposição (Tekwu et al., 2017). O mesmo efeito foi observado no nosso estudo para vermes adultos, porém em concentrações inferiores, 200 e 400 µg/mL. Outro estudo realizado por Quelemes et al., 2015, com extratode *Azadirachtaindica* A. Juss também demostrou ação esquistossomicida sobre os vermes adultos de *S. mansoni* nas concentrações de 200 e 300 µg/mL após 120 horas de incubação. Porém, este trabalhou não analisou a ultraestrutura do verme de *S. mansoni*.

Conclusão

Os resultados obtidos a partir da exposição das diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* permitem concluir que os extratos da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram atividade esquistossomicida contra os vermes jovens, esquistossômulos e vermes adultos, de *S. mansoni*. Além, de causar desacasalamento nos casais dos vermes adultos, principalmente em concentração mais altas (100, 200 e 400 µg/mL) e também foi possível observar alterações significativas nos tegumentos dos vermes adultos, jovens e esquistossômulos nas concentrações de 200 e 400 µg/mL através da microscopia eletrônica de varredura. Portanto, este trabalho abre perspectivas para futuras pesquisas sobre a utilização destas substancias *in vivo*.

Referência

Abdel-Hafeez, E. H.; Ahmad, A. K.; Abdulla, A. M.; Aabdel-Wahab, S.; Mosalem, F. A. Parasitol. Res. 2012, 111, 577.

Araújo, H. D., Santos, V. H., Brayner, F. A., Alves, L. C., Silva, N. H., Albuquerque, M. C., & Lima, V. L., 2020. In vitro activity of usnic acid potassium salt against different developmental stages of Schistosoma mansoni: An ultrastructural study. Acta tropica, 201, 105159.

Barsoum, Rashad S.; Esmat, Gamal; El-Baz, Tamer. Human schistosomiasis: clinical perspective. Journal of advanced research, 2013, 4.5: 433-444.

Caffrey C.R. Schistosomiasis and its treatment. Future Med Chem. 2015; 7:675–6.

Castro, A. T., Castro, A. P., Silva, M. S., De Souza, I. M. M., Martins-Souza, R. L., Chagas-Paula, D. A., & Marques, M. J. In vitro evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2, 6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of Senna spectabilis (Fabaceae). Bioorganic & medicinal chemistry letters, 26(17), 4197-4204, 2016.

Conceição, M.J., Coura, J.R., 2012. Epidemiology of schistosomiasis mansoni in Brazil. In: Mohammad Bagher Rokni, Schistosomiasis. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 83–192.

De Oliveira, R. N., Rehder, V. L. G., Oliveira, A. S. S., Jeraldo, V. D. L. S., Linhares, A. X., & Allegretti, S. M. (2014). Anthelmintic activity in vitro and in vivo of Baccharis trimera (Less) DC against immature and adult worms of Schistosoma mansoni. Experimental parasitology, 139, 63-72.

Gryseels, B.; Strickland, GM. Schistosomiasis.. In: Magill, AJ.; Hill, DR.; Solomon, T.; Ryan, ET., editors. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. 9th ed.. Elsevier; Philadelphia, PA, USA: 2013.

Inobaya, M. T., Olveda, R. M., Chau, T. N., Olveda, D. U., & Ross, A. G. (2014). Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. Research and reports in tropical medicine, 2014(5), 65.

Katz, N., Peixoto, S.W.V., 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 33 (3), 303–308 http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n3/2478.pdf.

Mantawy, M. M.; Ali, H. F.; Rizk, M. Z., 2011. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 53, 155.

Merrifield, M., Hotez, P. J., Beaumier, C. M., Gillespie, P., Strych, U., Hayward, T., & Bottazzi, M. E.. 2016. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. Vaccine, 34(26), 2988-2991.

Moraes, J., Almeida, A. A., Brito, M. R., Marques, T. H., Lima, T. C., De Sousa, D. P., & Freitas, R. M., 2013. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against Schistosoma mansoni. *Planta Medica*, *79*(03/04), 253-258.

Neves, B. J., Andrade, C. H., & Cravo, P. V., 2015. Natural products as leads in schistosome drug discovery. Molecules, 20(2), 1872-1903.

Moraes, J. "Natural products with antischistosomal activity," Future Medicinal Chemistry, vol. 7, no. 6, pp. 801–820, 2015.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

Saucha, C.V.V., da Silva, J.A.M., Amori, L.B., 2015. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco. Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília 24 (3), 497–506.

Quelemes, P. V., Perfeito, M. L., Guimarães, M. A., dos Santos, R. C., Lima, D. F., Nascimento, C. & de Moraes, J. (2015). Effect of neem (Azadirachta indica A. Juss) leaf extract on resistant Staphylococcus aureus biofilm formation and Schistosoma mansoni worms. Journal of ethnopharmacology, 175, 287-294.

Silva, H. A. M. F., Aires, A. L., Soares, C. L. R., Sá, J. L. F., Martins, M. C. B., Albuquerque, M. C. P. A., & Silva, N. H. (2020). Barbatic acid from Cladia aggregata (lichen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of Schistosoma mansoni. *Toxicology in Vitro*, 104771.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis 2006; 6: 411–425.

World Health Organization, 2010. First who report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/neglected diseases/ 2010report/en/.

WHO (World Health Organization) (2017) Schistosomiasis. Available at http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/ (accessed 15 de janeiro de 2020).

7.3 Artigo 3- Avaliação da atividade antitumoral e antioxidante *in vitro* do extrato bruto da casca de *schinus terebinthifolia* Raddi e suas frações.

Artigo a ser traduzido para o inglês, revisado e submetido ao periódico PHYTOTHERAPY RESEARCH no formato *Original Research Article* (**FI:** 3.76; **QUALIS CB II:** B1).

Manuscrito 3. Avaliação da atividade antitumoral e antioxidante *in vitro* do extrato bruto da casca de *schinus terebinthifolia* Raddi e suas fraçõe

RESUMO

O câncer é uma das doenças responsável pela morbidade e mortalidade das pessoas no mundo, tornando assim, uma importância problema para saúde publica em pais desenvolvidos e subdesenvolvidos. Os produtos naturais derivado de plantas medicinais têm sido fontes essenciais de compostos com propriedade antitumoral e antioxidante. O *Schinus terebinthifolia* Raddi é uma planta nativa do semiárido brasileiro, conhecida e decantada na Região Nordeste, principalmente no bioma Caatinga. No presente estudo foram avaliadas atividade antitumoral e antioxidante *in vitro* do extrato bruto da casca de *schinus terebinthifolia* e suas frações sobre as linhagens de células tumorais (HeLa e MDA-MB-231) e linhagem células normais de rim do macaco (células Vero), utilizando teste de MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide), teste de DPPH+ (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) e ABTS+ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). Os resultados da atividade antioxidante mostram que o extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) exibiram um excelente potencial antioxidante. Para EB a IC_{50} do teste de DPPH e ABTS foi 3.59 e 10.78 μg/mL e para FAE a IC_{50} do teste de DPPH e ABTS foi de 3.60 e 12.39 μg/mL, enquanto que para F8-16 do teste de DPPH e ABTS foi de 29.22 e 71.38 μg/mL. O *screening* da atividade citotóxica do EB, FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia* exibiram uma atividade citotóxica significativo para ambas as linhagens de células tumorais, onde para células de câncer cervical (HeLa) a CL_{50} foi de 81.47; 89.22 e 80.27 μg/mL e para as células de linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) a CL_{50} foi de 30.38; 21;85 e 35.88 μg/mL após 72 horas de incubação. Por outro lado, o EB, a FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia* exibiram uma redução da citotoxicidade sobre células Vero, linhagem de células não tumorais, e apresentaram a CL_{50} de 281,47; 304,95 e 326,05 μg/mL após 72 horas de exposição. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos da casca de *S. terebinthifolia* foram viáveis como agente antioxidante e antiproliferativos por apresentarem as ICs e CLs abaixo de 100 μg/mL. Ademais, os extratos da casca de *S. terebinthifolia* foram menos tóxicos para as células não tumorais.

Palavras chaves: Antioxidante, antitumoral, *Schinus terebinthifolia*.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais responsável pela morbidade e mortalidade das pessoas no mundo, tornando assim, uma importância problema para saúde publica em pais desenvolvidos e subdesenvolvidos (TRAEBERT et al., 2013; CHINEMBIRI et al., 2014; INCA, 2015). Em 2015, mais de 8,8 milhões de pessoas morreram vitima do câncer e é considerada a segunda causa de morte no mundo todo (WHO, 2017). Relatos na literatura mostram que no ano de 2012 pelo projeto Globocan/Iarc indicou que, dos 14 milhões de novos casos, mais de 60% aconteceram em países subdesenvolvidos e dos 8 milhões de mortes, 70% aconteceram nesses países.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INC), 2015, os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%).

De acordo com Instituto Nacional de Câncer (INC), 2018, no Brasil, a estimativa feita para 2018-2019, indica cerca de 600 mil casos novos de câncer para cada ano. Excluindo o câncer de pele não melanoma com a incidência de aproximadamente 180 mil casos novos, ocorrerão em torno de 420 mil casos novos de câncer. Enquanto que, o calculo global corrigido para sub-registro, indica a incidência de 640 mil de casos novos. Portanto, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INC), 2018, os tipos de câncer que serão mais incidentes são cânceres de próstata em homens em torno de 68 mil e mama em mulheres em torno 60 mil novos casos.

Entretanto, estudos apontam que, o emprego de mais de uma forma de tratamento, vem fornecendo resultados satisfatórios a depender do tipo de câncer. Apesar desse avanço no campo da oncologia, muitas doenças cancerígenas ainda exibem respostas fracas e discretas (Kummar et al., 2004). Por outro lado, os relatos na literatura mostram que, agentes antineoplápsicos utilizados atualmente, no tratamento de câncer possuem desvantagens como efeitos colaterais e adversos, apresentam toxicidades críticos e produção da resistência de muitos fármacos. Além, dessas desvantagens, esses agentes possuem altos custos e também são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (Newman et al., 2003; Iyer et al., 2013; Markman et al., 2013; Chinembiri et al., 2014).

Portanto, as desvantagens relacionadas ao tratamento convencional de doenças cancerígenas vêm aumentando o interesse dos pesquisadores a procura de novas drogas alternativas e complementares para o uso no tratamento das doenças malignas (Molassiotis et al., 2005; Chinembiri et al., 2014). Os compostos bioativos extraídos de plantas medicinais têm mostrado atividades promissoras como drogas antitumorais e também podem auxiliar na síntese de novas drogas (Chinembiri et al., 2014). Outros estudos apontam que os produtos naturais tem sido uma boa fonte de recursos alternativos, mais de 60% de drogas anticancerígenas aprovadas desde 1983 até 1994 eram de produtos naturais (Newman et al., 2003; Silva et al., 2009).

Schinus terebinthifolia Raddi é uma planta nativa do semiárido brasileiro, conhecida e decantada na Região Nordeste, principalmente no bioma Caatinga. Pertence à família Anacardiaceae é popularmente conhecido como aroeira de praia. A espécie *S. terebinthifolia* é considerada uma planta nativa do Sul e Centro das América e também há relatos da sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais da África e dos Estados Unidos (Dvorkin-Camiel, 2008; Vieira et al., 2015). Entre as regiões do Brasil, *S. terebinthifolia* encontra-se distribuído, na região Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste (Estevão et al., 2015).

De acordo com a literatura, o rastreamento fitoquímicos realizados com o gênero *Schinus*, revelaram a presença de terpenóides, ácidos graxos em *S. molle* e em *S. terebinthifolia* (Ceruks et al., 2007). Outros relatos na literatura em relação a perfil fitoquímica de *S. terebinthifolia* também mostra a presença de metabólitos tais como: compostos fenólicos simples, flavonoides e taninos, óleo essencial, esteroides, terpenoides, antraquinonas e saponinas (Lawrence, 1984; Lima et al., 2006).

O *S. terebinthifolia* possui uma grande importância na medicina popular. De acordo com a literatura, essa espécie é tradicionalmente usada na medicina popular no tratamento de ulcera, problemas respiratórios, feridas, reumatismo, gota, tumor, diarreia, doenças de pele, artrite (Morton, 1978; Lima et al., 2009). Além disso, há relatos do uso de *S. terebinthifolia* como anticéptico, anti-inflamatório e entre outras enfermidades. (Medeiros et al., 2007; Lima et al., 2009).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2. Obtenção de extrato e frações das cascas de *Schinus terebinthifolia* Riddi

O extrato bruto (EB) foi obtido das cascas de *Schinus terebinthifolia* por maceração, utilizando a proporção droga: solvente 10% (p/v), e etanol (40%, v/v) como líquido extrator durante 72 horas. Em seguida, a solução foi filtrada, concentrada em evaporador rotativo (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida, congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O extrato bruto resultante foi solubilizado em água destilada na proporção 10% (p/v) e em seguida a solução obtida foi particionada por solventes de polaridade crescente (acetato de etila - 10 vezes; n-butanol - 3 vezes). A fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa foram reunidas, concentradas em evaporador rotativo e posteriormente congeladas e liofilizadas, enquanto que a fação n-butanol foi reunida e seca em banho maria a 40 °C (Bueno et al., 2012). Os extratos foram mantidos em dessecadores até a realização dos ensaios analíticos e biológicos.

2.3. Prospecção fitoquímica da fração acetato de etila de *S. terebinthifolia* Raddi

Para as análises por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio de sílica gel 60 F_{254} (Merck®). O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, saponinas, esteroides e triterpenoides) utilizou sistemas de solventes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996). A análise dos resultados foi realizada mediante observação dos cromatogramas sob luz branca e ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

2.4. Cromatografia em Coluna Aberta (CC)

A fração acetato de etila foi submetida fracionamento por meio de cromatografia em coluna aberta utilizando Sephadex LH-20® como fase estacionária e metanol (MeOH) como fase móvel, com o objetivo de isolar as substâncias ativas (saponinas e compostos fenólicos). Portanto, foram coletados aproximadamente 12 mL por tubos e as frações foram monitoradas por CCD.

2.4. Análise qualitativa e quantitativa da fração acetato de etila das cascas de *Schinus terebinthifolia* Raddi por CLAE

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram preparadas soluções estoque da FAE de *Schinus terebinthifolia* e dos padrões ácido gálico (98% de pureza, Vetec®), ácido elágico (>95% de pureza, Sigma®) e catequina (98% de pureza Sigma®).

As soluções foram preparadas em água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®), na concentração de 1 mg/mL para a fração acetato, e nas concentrações de 10 µg/mL para as soluções padrão. As soluções foram filtradas em membranas de PVDF 0,45 µm (Chromafil®).

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific®), equipado com bomba binária com degaseificador e amostrador automático equipado com loop de 20 µL. Para a análise e processamento dos dados, foi utilizado o software Chromeleon 6.0 (Dionex, Thermo Fisher Scientific®, USA). A fase estacionária foi composta por coluna C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) da Dionex® equipada com pré-coluna (C_{18}, 4 mm × 3.9 µm, Phenomenex®); a fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B) ambas acidificadas com ácido trifluoroacético (0,05%). A eluição foi realizada em modo gradiente: 0–10 min, 12,5–25% B; 10–17 min, 25–40% B; 17–25 min, 40–70% B; 35–37 min, 75% B; 37–38 min, 75–10% B; o fluxo utilizado foi igual a 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada em 254, 270 e 280 nm, determinados de acordo com os máximos observados nos espectros de varredura dos picos dos padrões e amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os compostos foram identificados nas amostras através de comparação entre os tempos de retenção (t_R) do padrão e dos picos correspondentes presentes nas frações, além da análise de crescimento de área após fortificação da solução estoque da fração com as soluções padrão. Os teores de ácido gálico e/ou catequina foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\frac{\mathrm{Cp} \times \mathrm{AA}}{\mathrm{Ap} \times \mathrm{m}} \times \mathrm{FD} \times 100$$

Onde Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza do padrão); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra; FD = fator de diluição.

2.6. Atividade antioxidante *in vitro*

2.6.1. DPPH+ (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) scavenging activity

A avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto, da fração acetato de etila, da fração rica em saponinas e da fração rica em compostos fenólicos da casca de *Schinus terebinthifolia* pelo método de sequestro de radicais livres foi medida por doação de hidrogênio utilizando o radical estável DPPH (Blois, 1958). As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removida. Um análogo de vitamina E (Trolox-Sigma-Aldrich, Alemanha) e BHT (Sigma-Aldrich, Alemanha)

foi usado como padrão. A percentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação: I% = [(Abs0 -Abs1) / Abs0] x 100, em que Abs0 é a absorvância do controlo e Abs1 é a absorvância do extrato hidroalcóolico, da fração acetato de etila, da fração rica em saponinas e da fração rica em compostos fenólicos da casca de *Schinus terebinthifolia*.

2.6.2. ABTS+ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) scavenging activity

A atividade antioxidante de do extrato bruto, da fração acetato de etila, da fração rica em saponinas e da fração rica em compostos fenólicos da casca de *Schinus terebinthifolia* pelo ensaio ABTS foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido da oxidação de ABTS por persulfato de potássio (Re et al., 1999). Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Um análogo de vitamina E (Trolox-Sigma-Aldrich, Alemanha) e BHT (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi usado como padrão. A percentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação: I% = [(Abs0 -Abs1) / Abs0] x 100, em que Abs0 é a absorbância do controlo e Abs1 é a absorbância do extrato hidroalcóolico, da fração acetato de etila, da fração rica em saponinas e da fração rica em compostos fenólicos da casca de *Schinus terebinthifolia*.

2.6.3. Capacidade antioxidante total (TAC)

A Capacidade Total de Antioxidante foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (Prieto et al., 1999). Utilizou-se ácido ascórbico como referência e a Capacidade Total de Antioxidante foram expressas como equivalente de ácido ascórbico. O TAC (%) foi calculado utilizando a seguinte fórmula: TAC (%) = [(absorbância da amostra - absorbância do branco) / (absorbância do ácido ascórbico - absorbância do branco) x 100]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.7. Atividade antitumoral

2.7.1 Cultivo celular

As linhagens de células cancerígenas utilizadas no trabalho foram HeLa (células de câncer cervical humano) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário). Como controle de células normais foi utilizado a linhagem VERO (células de rim de macaco-verde africano). HeLa e VERO foram cultivadas no meio DMEM enquanto a MDA-MB-231 em RPMI, ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As linhagens celulares ficaram incubadas a 37 ºC em atmosfera com

5% de CO2 e ao atingirem confluência de 80% ou mais, elas foram tratadas com solução de tripsina 0,5% - EDTA 0,025% por 5 min a 37 ºC, a fim de soltar as células aderidas ao frasco de cultura. Após a incubação, as células desprendidas foram coletadas e meio de cultura suplementado com SFB foi adicionado para inibir a ação proteolítica da tripsina. A densidade celular foi estimada através da contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para experimentos posteriores foi utilizado uma densidade celular de 1 x 10^5 células/mL.

2.7.2 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

A capacidade citotóxica foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich), o qual consiste na redução desse composto por meio de redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando cristais azuis de formazan. Primeiro, as células foram incubadas em placas de 96 poços durante 24 h para promover a adesão celular. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com tampão fosfato salina (PBS). Antes da incubação com as células, 10 mg das amostras (EB, FAE, F3-7, F8-18) foram diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e agitadas em banho ultrassom por 20 min. Por conseguinte, essas amostras foram diluídas nos meios de cultura apropriados para as linhagens de modo que 100 µL dessas amostras em diferentes concentrações (300-25 µg/mL) foram incubadas com as células. Como controle de viabilidade celular utilizou-se células incubadas apenas com meio de cultura e o controle de morte celular foi obtido pela incubação com DMSO (50% v/v em meio de cultura). As células tratadas e os controles foram incubados em quintuplicata a 37 ºC e 5% de CO2 por 72h. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e 100 µL de meio contendo 10 µL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado. Após 3h de incubação a solução contendo MTT foi removida e os cristais de formazan formados foram solubilizados por agitação durante 15 min com DMSO. A viabilidade celular foi medida pela comparação da absorbância (λ = 595 nm) entre os grupos tratados e o controle não tratado.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil fitoquímico do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) da casca de *Schinus terebinthifolia* Raddi.

O fracionamento da fração acetato através da coluna aberta em gel de Sephadex LH-20 rendeu 20 frações, as quais foram analisadas por CCD. Esta análise permitiu a separação de dois grupos: as frações 3-7 apresentaram-se ricas em saponinas e as frações 8-16 apresentaram-se ricas em compostos fenólicos. As frações 8-16 foram reunidas e selecionadas para os experimentos.

Na tabela 1 encontram-se as classes que apresentaram resultado positivo para a EB, FAE, F3-7 e F8-18, de *S. terebinthifolia*. Os resultados foram evidenciados a partir da comparação do fator de retenção (F_R) e coloração das bandas das amostras que correspondiam aos padrões avaliados. Portanto, foi evidenciada a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, saponinas, açúcares, esteroides e terpenoides.

Tabela 12- Análises por cromatografia de camada delgada do extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos e saponinas da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.

Classes	**EB**	**FAE**	**F 8-16**	**F 3-7**
Esteroides (β-sitosterol)	+	+	-	+
Terpenoides(β-sitosterol)	+	+	-	+
Saponinas (saponinas)	+	+	-	+
Flavonoides (quercetina)	+	+	+	+
Taninos hidrolisáveis (ácido gálico)	+	+	+	-
Taninos condensados (catequinas)	+	+	+	-

Sinal (+) indica a presença dos constituintes químicos e Sinal (-) indica a ausência dos constituintes químicos.

Nas análises por CLAE-DAD foram evidenciadas a presença de ácido gálico (pico 1, t_R = 8,87 min) e catequina (pico 2, t_R = 17,2 min) no EB, FAE e F8-16 (Figura 1) das cascas de *S. terebinthifolia*. A presença dos compostos foi confirmada pela co-injeção dos padrões e amostras, tempos de retenção e espectros de varredura dos picos (Figura 2).

Figura 32- Cromatogramas obtidos por CLAE para EB (A); FAE (B) e F8-16 (C) obtidos das cascas de *S. terebinthifolia* Radd.

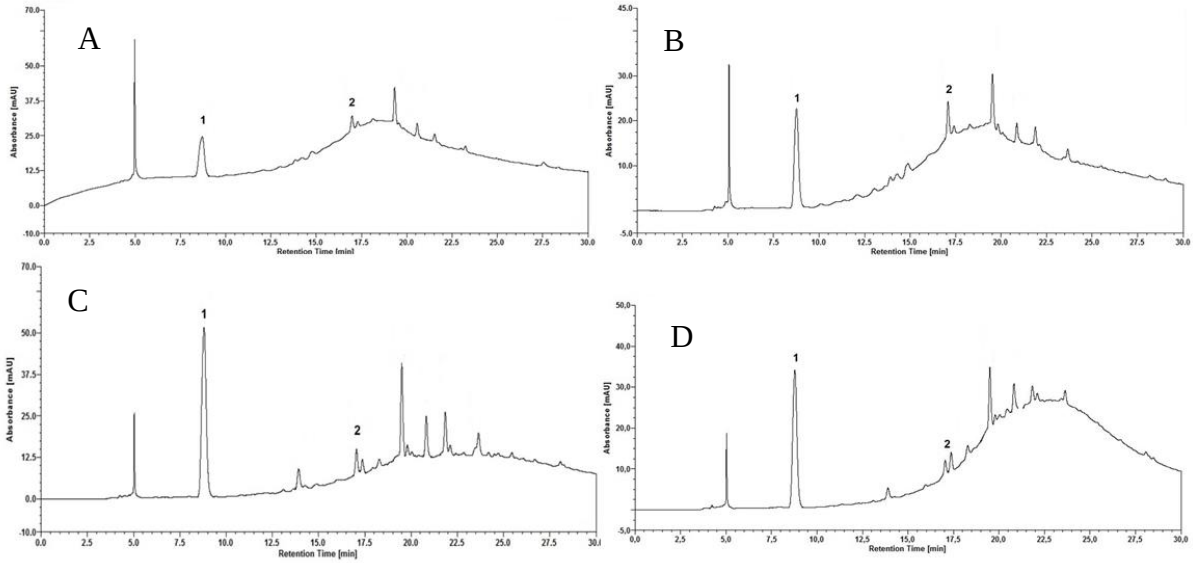
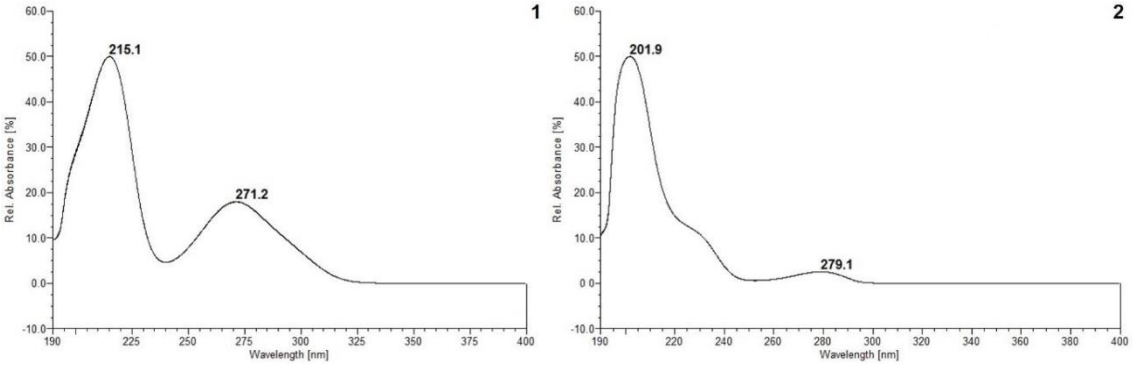


Figura 33- Espectros de varredura dos picos referentes à presença de ácido gálico e catequina na amostra evidenciados nas amostras da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.



As análises por CLAE-DAD também permitiram quantificar estes metabólitos nas amostras do EB, FAE, fração rica em saponina e fração rica em compostos fenólicos (F8-16) como mostra a tabela 2. A FAE e F8-16 apresentaram maiores teores de ácido gálico quando comparadas ao EB. Por outro lado, o EB e F8-16 exibiram maiores teores das catequinas quando comparados a FAE.

Tabela 13- Teores de ácido gálico e catequina calculados nas amostras de *Schinus terebinthifolia*, obtidos por CLAE.

Amostras	g% AG	g% CAT
EB	0,17 (1,30)	0,09000 (0,56)
FAE	0,20 (2,20)	0,089000 (0,05)
F3-7	0,36 (2,40)	0,095000 (0,54)
F8-16	0,26 (2,13)	0,097000 (0,15)

EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; F3-7: fração rica em saponinas; F8-16: fração rica em compostos fenólicos; g%: gramas de metabólito por 100 g de resíduo seco; AG: Ácido gálico; CAT: Catequina. Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo).

3.2. Atividade antioxidante *in vitro* e determinação dos fenóis totais

De modo geral, a atividade antioxidante está associada á alto teor de compostos fenólicos no material vegetal, por tanto, o teor de compostos fenólicos foi determinado no EB da casca de *S. terebinthifolia* e suas frações. Na tabela 3 encontram-se os resultados da determinação de fenóis totais no extrato bruto e frações. No entanto, quanto maior a quantidades do ácido gálico encontrada em equivalente por grama EB e frações, maior a percentagem de compostos fenólicos determinados. Os resultados da determinação de fenóis totais revelam que o EB e FAE da casca de *S. terebinthifolia* exibiram maior teor de compostos fenólicos em comparação com as frações ricas em saponinas (F3-7) e compostos fenólicos (F8-16).

Tabela 14- Teor de polifenóis totais (TPT) do extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia* Raddi.

Amostras	TPT (g%)
EB	45,20 ± 0,14 (0,32)
FAE	44,87 ± 0,22 (0,49)
F3-7	20,44 ± 0,24 (1,21)
F8-16	26,08 ± 0,11 (0,43)

TPT: teor de polifenóis totais; EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; F3-7: fração rica em saponinas; F8-16: fração rica em compostos fenólicos.

A tabela 4 ilustra os resultados da IC_{50} da atividade antioxidante dos diferentes extratos da casca de *S. terebinthifolia*. Os resultados apontam que o EB, FAE e F8-16 exibiram um excelente potencial antioxidante. Portanto, pode-se observar que EB e FAE também apresentaram maior capacidade de captação de radicais livres e seguidos de fração rica em compostos fenólicos como era esperado.

Tabela 15- Resultados da concentração inibitória o extrato bruto, fração acetato de etila e fração rica em compostos fenólicos da casca de *S. terebinthifolia Raddi*.

Sample	**DPPH•+** IC_{50} **(µg/mL)**	**ABTS•+** IC_{50} **(µg/mL)**	**TAC** IC_{50} **(µg/mL)**
Trolox	65.31	145.29	N.D.
Ascorbic Acid	ND.	N.D.	502.11
BHT	293.46	498.13	N.D.
EB	3.59	10.78	52.78
FAE	3.60	12.39	69.23
F3-7	101.38	242.45	573.19
F8-16	29.22	71.38	123.48

DPPH: 2,2-((diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate); ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)); TAC: Total antioxidant capacity; ND - Not determined. EB: extrato hidroalcóolico; FAE: fração acetato de etila; F3-7: fração rica em saponinas; F8-16: fração rica em compostos fenólicos.

3.3. Atividades citotóxicas *in vitro*

Os efeitos citotóxicos de todos os extratos (EB, FAE, F3-7 e F8-1363) foram determinados sobre a viabilidade das células de linhagens cancerígenas, HeLa (linhagem de tumor de câncer cervical) e MDA (linhagem de câncer de mama) através do teste MTT. Onde o *screening* da atividade citotóxica do EB, FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia* exibiram a CL_{50} abaixo de 100 µg/mL para ambas as linhagens de células tumorais, enquanto que a F8-16 exibiu a CL_{50} acima de 100 µg/mL como ilustra a tabela 5. Ademais, as células da linhagem de câncer de mama (MDA) foram mais sensíveis ao EB, FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia* (Tabela 5). Por outro lado, as células de linhagem normal (células Vero) incubados com o EB, FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia* foram menos sensíveis a esses

extratos quando comparados com as células tumorais de ambas as linhagens, apresentando a CL_{50} acima de 100 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 16- Atividade citotóxica do extrato bruto e suas frações da casca de *Schinus terebinthefolia* Raddi sobre linhagem tumorais humano, HeLa e MDA e células normais (Células vero).

	HeLa	**MDA**	**Células Vero**
	CL_{50} µg/mL (95% LC)	**CL_{50} µg/mL (95% LC)**	**CL_{50} µg/mL (95% LC)**
EB	81,47(71,54-91,40)	30,38 (25,69-35,07)	281,47 (270,46 - 292,49)
F. EA	89,22(79,44-99)	21,85 (16,10-27,6)	304,95 (295,51 - 314,39)
F. 3-7	80,27 (62,64-97,90)	35,88 (29,06-42,70)	326,05 (313,95 - 338,15)
F. 8-16	234,46 (225,11-243,81)	212,48 (200,93-224,03)	----------

HeLa: linhagem de tumor de câncer cervical; MDA: linhagem de câncer de mama; EB: extrato hidroalcóolico; FAE: fração acetato de etila; F3-7: fração rica em saponinas; F8-16: fração rica em compostos fenólicos.

A figura 3 e 4 ilustram os resultados da analise estatístico da viabilidade celular de duas linhagens de células cancerígenas (HeLa e MDA), incubadas as diferentes concentrações do EB, da FAE, F3-7 e F8-16 da casca de *S. terebinthifolia*, após 72 horas. Onde foi observada que todas as concentrações utilizadas no teste sobre as duas linhagens apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($^{*}P< 0.05$ e $^{***}P< 0.0001$) quando comparadas ao grupo controle negativo, respectivamente. Também foi possível constatar com esses resultados, que a redução da viabilidade celular aumentou de acordo com aumento das concentrações, o que revela um efeito dose dependente. Enquanto que, na figura 5 ilustram os resultados da viabilidade celular da linhagem de células normais, células Vero (células de linhagem do rim de macaco). Os resultados nos permitem constatar que as células de linhagem normal (células Vero) foram menos sensíveis ao BE, FAE e F3-7 da casca de *S. terebinthifolia*, onde apenas nas concentrações de 200 e 300 µg/mL foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle negativo, respectivamente. O efeito também foi dose dependente.

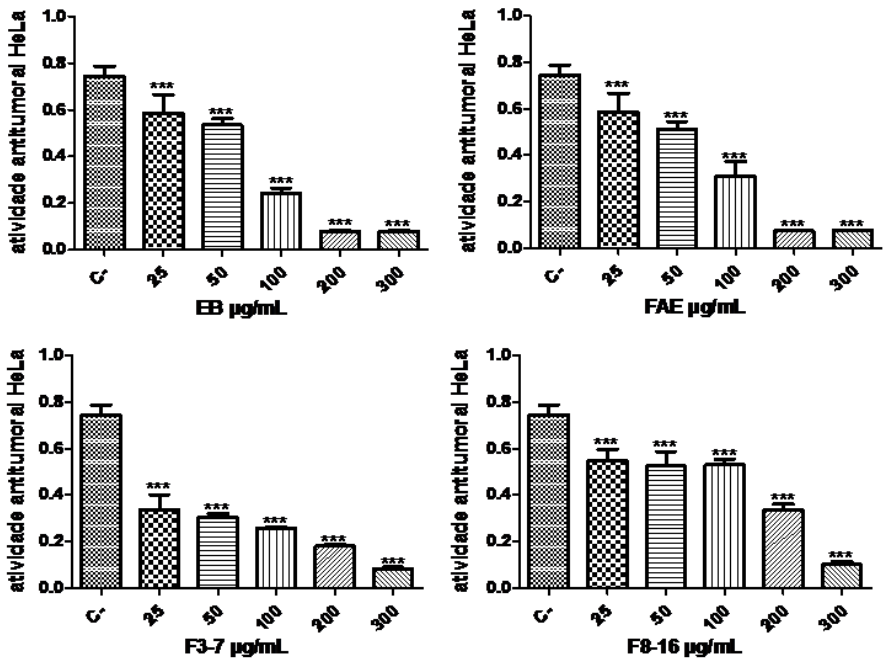


Figura 34- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células tumorais, HeLa- linhagem de tumor de câncer cervical, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas e F8-16 – fração rica em compostos fenólicos.

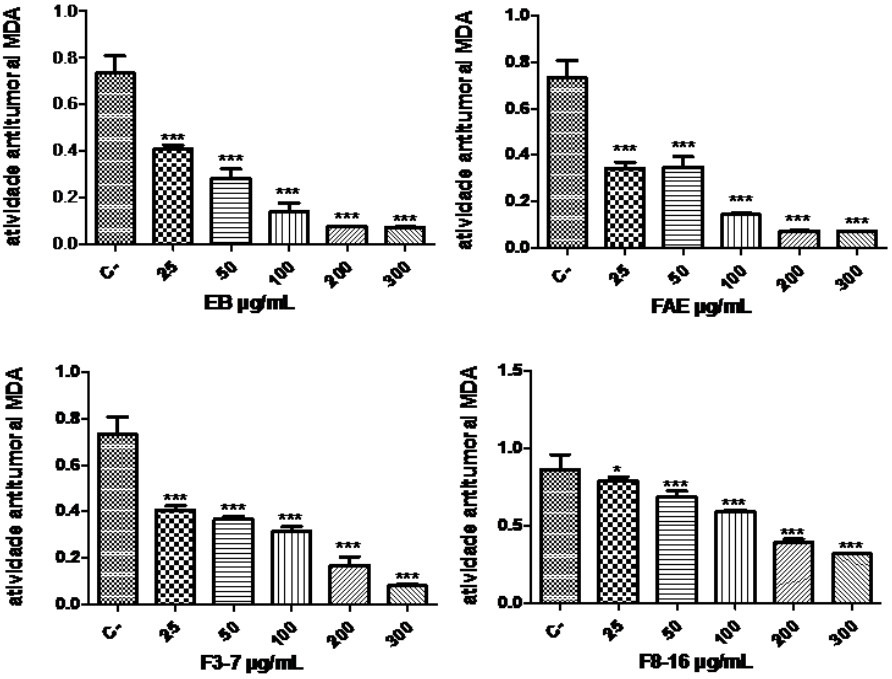


Figure 35- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células tumorais MDA- linhagem de câncer de mama, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas e F8-16 – fração rica em compostos fenólicos.

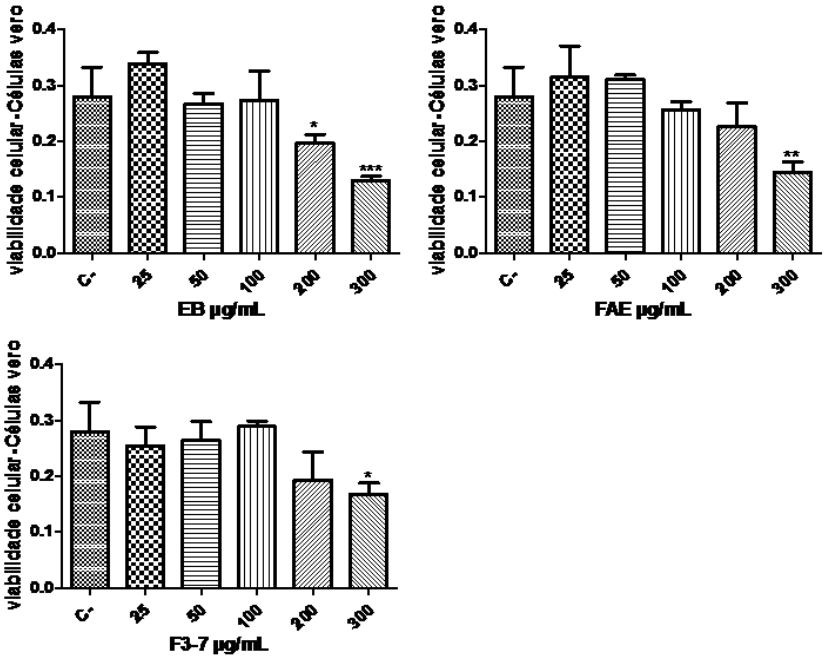


Figura 36- Resultados da viabilidade celular da linhagem de células normais, células Vero- linhagem de células de macaco, expostos ao EB- extrato bruto, FAE – fração acetato de etila, F3-7 – fração rica em saponinas.

4. DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem constatar que as amostra da casca de *S. terebinthifolia* possuem uma citotoxicidade seletiva de diferentes linhagens de células tumorais e exibiram uma diminuição da atividade em células de linhagem normal. As substancias de origem natural são largamente aplicadas no controle e tratamento de neoplasia maligna e tem sido fontes essenciais dos compostos com propriedade antitumoral (Hartwel, 1982). Estudos apontam que, mais de 60% dos medicamentos anticancerígenas são derivados de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003; SILVA et al., 2009). Portanto, os resultados da atividade antitumoral apresentado pelas amostras da casca de *S. terebinthifolia* abriram novas possibilidades de estudo de câncer por essa planta (Tabela 5).

Para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de extratos vegetais, é de grande relevância uma pesquisa detalhada do perfil fitoquímico da planta em estudo. No presente estudo a prospecção fitoquímico das amostras de *S. terebinthifolia* revelaram a presença de metabolitos secundários, como taninos, saponinas, terpenoides, esteroides, flavonoides e açucares. Entre esses compostos identificados nos extratos da casca de *S. terebinthifolia,* alguns como, por exemplo, terpenoides, esteroides, flavonoides e derivados de

taninos foram relatados como compostos com atividade antitumoral (Alhusainy et al., 2014; Kaur et al., 2014; Pacifico et al., 2013; González-Sarrías et al., 2012). Diante desses relatos dos compostos identificados nas amostras da casca de *S. terebinthifolia*, também constituiem um campo promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos antitumoral a partir de derivados de plantas medicinais (Tabela 5).

Até o momento, não há relatos na literatura sobre atividade antitumoral das amostras da casca *S. terebinthifolia* frente às linhagens de células tumorais, HeLa e MDA. Porém, outros estudos com extratos de planta, mostraram atividade antiproliferativa de extratos de alecrim contra as células de câncer de mama (MCF-7 e MAD-MB-468), apresentando IC_{50} de 90 e 26.8 μg/mL após 120 horas de incubação, enquanto que para células de câncer de colo de útero a IC_{50} foi de 23.31 μg/mL após 72 horas de exposição (Moore et al 2016). A atividade antitumoral do extrato hidroalcóolico da casca de *Acacia seyal* sobres células de linhagem de câncer de mama (MCF-7 e MAD-MB-468), onde foi observada uma citotoxicidade significativa em uma das linhagens de câncer de mama, MCF-7 com a IC_{50} de 100 μg/mL e para o MDA-MB-231 citotoxicidade foi menos significativo a IC_{50} foi de 265 μg/mL após 24 horas de exposição.

Em relação à atividade antioxidante, estudos na literatura apontam que a tividade antioxidante está intimamente relacionda a presença de alto teor de compostos fenólicos. Por outro lado, estudos também apontam que as espécies da familia Anacardiaceae têm apresentado um potencial antioxidante (Moyo et al., 2010; Okoth et al., 2013; Ajileye et al., 2015). Portanto, os resultados do nosso estudo mostraram um potencial antioxidade frente ao DPPH e ABTS. E os resultados da prospecção fitoquimica mostraram apresença de copostos fenólicos como favonoides e taninos. Dois estudos realizados, uma com extrato da folha e outro fruto de *S. terebinthifolia* e suas frações apresentaram potencial antioxidante e essa atividade foi atribuída ao alto teor compostos fenólicos como flavonoides e taninos identificados nessas amostras (Silva et al., 2017; Rocha et al., 2019), coraborando assim com os resultados do nosso estudo.

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos a partir da exposição de células tumorais e não tumorais aos extratos da casca de *S. terebinthifolia*, pode-se concluir que o EB, a FAE e F3-7 exibiram citotoxicidade significativa para ambas às linhagens de células tumorais, principalmente, para a linhagem de câncer de mama com CL_{50} de 30,38; 21,85 e 35,88 μg/mL, enquanto que os extratos da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram citotoxicidade reduzida para a linhagem células de normais. E os resultados da atividade antioxidante mostram que o EB, FAE e F8-16 exibiram um excelente potencial antioxidante.

4. REFERENCIAS

Alhusainy, W., Williams, G. M., Jeffrey, A. M., Iatropoulos, M. J., Taylor, S., Adams, T. B., & Rietjens, I. M. (2014). The natural basil flavonoid nevadensin protects against a methyleugenol-induced marker of hepatocarcinogenicity in male F344 rat. Food and chemical toxicology, 74, 28-34.

Ajileye, O. O., Obuotor, E. M., Akinkunmi, E. O., & Aderogba, M. A. (2015). Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from Anacardium occidentale L.(Anacardiaceae) leaf extract. *Journal of King Saud University-Science*, *27*(3), 244-252.

Brasil, M. S. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa. (2016). Incidência de câncer no Brasil [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 20]; 11: 122p.

Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O.A., Lago, J.H.G. (2007). Constituintes fenólicos polares de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae). Química Nova 30, 597–599.

Chinembiri, T. N., Du Plessis, L. H., Gerber, M., Hamman, J. H., & Du Plessis, J. (2014). Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules*, *19*(8), 11679-11721.

Dvorkin-Camiel, L., & Whelan, J.S. (2008). **Tropical american plants in the treatment of infectious diseases.** Journal of dietary supplements, *5*(4), 349-372.

Estevão, L. R. M., Medeiros, J. P. D., Simões, R. S., Arantes, R. M. E., Rachid, M. A., Silva, R. M. G. D., & Evêncio-Neto, J. (2015). **Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolia* Raddi).** Acta Cirurgica Brasileira, *30*(4), 289-295.

González-Sarrías A., Yuan T., Seeram N.P. (2012). Cytotoxicity and structure activity relationship studies of maplexins A-I, gallotannins from red maple (*Acer rubrum*). *Food Chem Toxicol.* 50: 1369-76.

Iyer, A.K.; Singh, A.; Ganta, S.; Amiji, M.M. (2013). Role of integrated cancer nanomedicine inovercoming drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev. 65*, 1784–1802.

Kaur, P., Kaur, V., Kumar, M., & Kaur, S. (2014). Suppression of SOS response in E. coli PQ 37, antioxidant potential and antiproliferative action of methanolic extract of Pteris vittata L. on human MCF-7 breast cancer cells. Food and chemical toxicology, 74, 326-333.

Kummar V, Abbas A, Fausto N. (2004). *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: WB Saunders;

Lawrence, B. (1984). A discussion of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolia*. **Perfumer & Flavorist**, v. 9, p. 65-69.

Lima, L.B., Vasconcelos, C.F.B., Maranhão, H.M.L., Leite, V.R., Ferreira, P.A., Andrade, B.A. & Wanderley, A.G. (2009). Acute and subacute toxicity of Schinus terebinthifolius bark extract. *Journal of ethnopharmacology*, *126*(3), 468-473.

Lima, M.R.F., Luna, J.S., Santos, A.F., Andrade, M.C.C., Sant'ana, A.E.G., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N. (2006). Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 105, 137–147.

Markman, J.L.; Rekechenetskiy, A.; Holler, E.; Ljubimova, J.Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev. 65*, 1866–1879.

Medeiros, K.C.P., Monteiro, J.C., Diniz, M.F.F.M., Medeiros, I.A., Silva, B.A., Piuvezam, M.R., (2007). Effect of the activity of the brazilian polyherbal formulation: Eucalyptus globulus Labill, Peltodon radicans Pohl and Schinus terebinthifolius Radd in inflammatory models. Brazilian Journal of Pharmacognosy 17, 23–28.

Molassiotis, A.; Fernandez-Ortega, P.; Pud, D.; Ozden, G.; Scott, J.A.; Panteli, V.; Margulies, A.; Browall, M.; Magri, M.; Selvekerova, S. (2005). Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. *Ann. Oncol. 16*, 655–663.

Moore, J., Yousef, M., & Tsiani, E. (2016). Anticancer effects of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients*, *8*(11), 731.

Morton, J.F. (1978). Brazilian pepper – its impact on people, animals and the environment. Economic Botany 32, 353–359.

Moyo, M., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of Sclerocarya birrea and Harpephyllum caffrum (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, *123*(1), 69-76.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. J. Nat. Prod. 66, 1022–1037.

Pacifico, S., Gallicchio, M., Lorenz, P., Potenza, N., Galasso, S., Marciano, S. & Monaco, P. (2013). Apolar Laurus nobilis leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. Food and chemical toxicology, 62, 628-637.

Okoth, D. A., Chenia, H. Y., & Koorbanally, N. A. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from Lannea alata (Engl.) Engl.(Anacardiaceae). *Phytochemistry Letters*, *6*(3), 476-481.

Rocha, P. D. S., de Araújo Boleti, A. P., do Carmo Vieira, M., Carollo, C. A., da Silva, D. B., Estevinho, L. M., ... & de Picoli Souza, K. (2019). Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of Schinus terebinthifolius Raddi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *220*, 36-46.

Silva, D. B., Tulli, E. C. O., Militão, G. C. G., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., De Moraes, M. O., ... & De Siqueira, J. M. (2009). The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from Duguetia furfuracea. *Phytomedicine*, *16*(11), 1059-1063.

Silva, M. M., Iriguchi, E. K., Kassuya, C. A. L., do Carmo Vieira, M., Foglio, M. A., de Carvalho, J. E., ... & Formagio, A. S. (2017). Schinus terebinthifolius: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *27*(4), 445-452.

Traebert, J., Schneider, I. J. C., Colussi, C. F., & de Lacerda, J. T. (2013). Burden of disease due to cancer in a Southern Brazilian state. *Cancer epidemiology*, *37*(6), 788-792.

Vieira, M. N., Costa, F. N., Leitão, G. G., Garrard, I., Hewitson, P., Ignatova, S. & Jerz, G. (2015). *Schinus terebinthifolia* scale-up countercurrent chromatography (Part I): High performance countercurrent chromatography fractionation of triterpene acids with off-line detection using atmospheric pressure chemical ionization mass **spectrometry.** Journal of Chromatography A, *1389*, 39-48.

www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento, acessada outubro, 2017.

www.who.int/cancer/en/ acessada outubro, 2017.

www.who.int/cancer/tratament, acessada outubro, 2017.

www.who.int/cancer/treatment/en/, acessada outubro, 2017.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos da exposição dos organismos testes permite concluir que:

- Os testes fitoquímicos (CCD e CLAE) do extrato bruto da casca de *S. terebinthifolius* e suas frações revelaram a presença de saponinas, taninos, esteroides, flavonoides, trepenóides, fenóis, açucares, acido gálico, e catequinas.
- As frações de FAE e F8-16 originária do extrato da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram atividade moluscicida contra moluscos adultos de *B. glabrata*, enquanto apresentam baixa toxicidade ao ambiente de acordo com o ensaio artemicida.

- O teste do MN e ensaio cometa demonstrou que EB de *S. terebinthifolia* e suas frações FAE e F8-16 agem sobre as células de defesa do molusco *B. glabrata*, causando diferentes alteraçoes celulares nos hemocitos MN, BC e apoptose celular, além de causar danos significativos no DNA.

- O EB e FAE da casca de *S. terebinthefolius* mostraram-se viáveis como esquistossomicida de origem vegetal nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL e para F8-16 nas concentrações de 200 e 400 µg/mL após 120 horas de incubação.

- As amostras de *S. terebinthefolius* causaram desacasalamento nos casais dos vermes adultos, principalmente em concentração mais altas (100, 200 e 400 µg/mL) e após analise da ultraestrutura foi possível observar alterações significativas nos tegumentos dos vermes adultos, jovens e esquistossômulos *S. mansoni* provocada pelas amostras de *S. terebinthefolius* nas concentrações de 200 e 400 µg/mL.

- O EB, a FAE e F3-7 exibiram citotoxicidade significativa para ambas às linhagens de células tumorais, principalmente, para a linhagem de câncer de mama com CL_{50} de 30,38; 21,85 e 35,88 µg/mL, enquanto os extratos da casca de *S. terebinthifolia* apresentaram citotoxicidade reduzida para a linhagem células de normais.

REFERENCIAS

ABDULLA, M. H.; LIM, K. C.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Med.**, v. 4, p. e14, 2007.

ABDUL-GHANI, R., LOUTFY, N., EL SAHN, A., & HASSAN, A. (2009). Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitology research*, *104*(5), 955.

ALBUQUERQUE, U.P., OLIVEIRA, R.F., 2007. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 113(1), 156170. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.025.

AIRES, L. A., XIMENES, E. C., SILVA, R. A., BARBOSA, V. X., GÓES, A. J., PEIXOTO, C. A., ... & ALBUQUERQUE, M. C. (2014). Ultrastructural analysis of β-lapachone-induced surface membrane damage in male adult Schistosoma mansoni BH strain worms. *Experimental parasitology*, *142*, 83-90.

ALIBEK, K.; KAKPENOVA, A.; BAIKEN, Y. Role of infectious agentes in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. **Infectious Agents and Cancer**, doi:10.1186/1750-9378-8-7, p.1-9, 2013.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALMEIDA, B. R. **Malacologia dos gêneros Lymnaea e Biomphalaria na mesorregião sul espírito-santense, e a avaliação de extratos de Melia azedarach, Azadirachta indica, e Cymbopogon winterianus como agentes moluscicidas**. Alegre, 2010. 171p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.

AMARAL, R. G. (2014). Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da Mentha x villosa (Lamiceae).

AMARAL R.S3., TAUIL P. L., LIMA D. D., ENGELS D. 2006. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101* (Suppl I): 79-85.

AMARAL R. S., PORTO M. A. S. **Evolução e Situação Atual do Controle da Esquistossomose no Brasil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1994; 27: 73-90.

AMORIM, M. M. R. de; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi): Ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ANDRADE, Z. A.; dos SANTOS, H. A.; BOROJEVIC, R.; GRIMAUD, J. A. Lesões hepáticas produzidas por hicanthone (Etrenol). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 16, p. 160-170, 1974.

ARAUJO, K. C. G. M. **Distribuição especial de foco de esquistossomose através de sistemas de informações geográfica**- SIG, ilha de Itamaracá, Pernambuco. Dissertação do Mestrado em Saúde Pública **– Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CpqAM, da Fundação Osvaldo Cruz**, Recife 2004.

ARCHIBALD R. G. **The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan**. T Roy Soc Trop Med H 27: 207-210, 1933.

Araújo, H. D., Silva, L. R., Siqueira, W. N., Fonseca, C. S., Silva, N. H., Melo, A. M., & Lima, V. L. (2018). Toxicity of Usnic Acid from Cladonia substellata (Lichen) to embryos and adults of Biomphalaria glabrata. *Acta tropica*, *179*, 39-43.

BABILI F. E., FABRE N., MOULIS C., FOURASTE I. 2006. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris. Fitoterapia 77*: 384-387.

BARR, S. G.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 5160-5161, 2005.

BARBIERI, D.S., TONIAL, F., LOPEZ, P.V., MAIA, B.H.S., SANTOS, G.D., RIBAS, M.O., VICENTE, V.A., 2014. Antiadherent activity of Schinus terebinthifolius and Croton urucurana extracts on in vitro biofilm formation of Candida albicans and Streptococcus mutans. Arch. Oral Biol. 59(9), 887-896. http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006.

BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia Da Esquistossomose No Litoral De Pernambuco. Revista de Patologia Tropical v. 43, n. 4 , 15 jan. 2015. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/33607>. Acesso em: 22 set.

BARBOZA, D. M., ZHANG, C., SANTOS, N. C., SILVA, M. M. B. L., ROLLEMBERG, C. V. V., DE AMORIM, F. J. R., & DE JESUS, A. R. **Biomphalaria species distribution and its effect on human *Schistosoma mansoni* infection in an irrigated area used for rice cultivation in northeast Brazil.** *Geospatial health*, *6*(3), 103-109, 2012.

BARBOSA, C. S. et al. **The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 106, n. 7, p. 878–883, 2011.

BENDAOUD, H., ROMDHANE, M., SOUCHARD, J.P., CAZAUX, S., BOUAJILA, J., 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils. J. Food Sci. 75(6), 466-472.2015.

BENNETT, J. L., DAY, T., LIANG, F. T., ISMAIL, M. & FARGHALY, A. (1997). The develonment of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. Experimental Parasitology, 87, 260-267.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 309-314, 2002.

BLANCHARDS, T. J. Schistosomiasis. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 2, p. 5-11, 2004.
BONT, J. D.; VERCRUYSSE, J. Schistosomiasis in cattle. *Advances in parasitology*, 41: 285-364, 1998.

BÓRIO, E. B. L. Contribuição ao estudo farmacognóstico da casca do caule da Aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) – Anacardiaceae. **Ciência e Cultura**. v. 25, n. 7, p. 631-637, 1973.

BOROS, L. P. **Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira).**2007. 85f. Dissertação (Mestradoem Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná, Paraná,2007.

BOUT, D. T.; DESLÉE, D.; CAPRON, A. Protection against schistosomiasis produced by cyclosporine A. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 185-186, 1984.

BOUT, D.; DESLÉE, D.; CAPRON, A. Antischistosomal effect of cyclosporin A: cure and prevention of mouse and rat schistosomiasis mansoni. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 823–827, 1986.

BRACKENBURY, T. D.; APPLETON, C.C.; THURMAN, G. **Mammal toxicily assessment o f the plant molluscicide. *Apodyles dimidiara* (Icacinaceae) in South Africa**. *Acta Tropica, 65:* 155- 162 1997.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v.33, p.1359-1369, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. Ed. – Brasília, Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL, M. S. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ESTIMATIVA 2016: Incidência de câncer no Brasil [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 20]; 11: 122p.

BRENTANO, D. M. (2006). Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com Daphnia magna: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C.; BUNDY, D. A. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. **Adv. Parasitol.**, v. 62, p. 221-261, 2006.

BULLA, M. K., HERNANDES, L., BAESSO, M. L., NOGUEIRA, A. C., BENTO, A. C., BORTOLUZZI, B. B., ... & CORTEZ, D. A. (2015). Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the Schinus terebinthifolius Raddi extract. *Photochemistry and photobiology*, *91*(3), 558-566.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. Revista Brasileira de Farmacognosia v. 20, p. 282–6, 2010.

CAVALHER-MACHADO, S. C., ROSAS, E. C., DE ALMEIDA BRITO, F., HERINGE, A. P., DE OLIVEIRA, R. R., KAPLAN, M. A. C., ... & DE OLIVEIRA, M. D. G. M. (2008). The anti-allergic activity of the acetate fraction of Schinus terebinthifolius leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, *8*(11), 1552-1560.

CARVALHO, M.C.R.D.; BARCA, F.N.T.V.; AGNEZ-LIMA.; L.F.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolia* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, n.3, p. 185-191, 2003.

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.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolia* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.1, p.158-169, 2013.

CASTRO, A. K. S. Avaliação clínica-epidemiológica da esquistossomose mansoni em Comercinho, MG (1981-2005). Dissertação do Curso de Pós – Graduação em Medicina/Biomedicina. Belo Horizonte, fevereiro de 2009.

CAVALCANTE, MF., OLIVEIRA, MCC., VELANDIA, JR. and ECHEVARRIA, A., 2000. Síntese de 1. 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, vol. 23, no. 1, p. 20-22.

CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 828-833, 2008.

CHABNER, B. A., & ROBERTS JR, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, *5*(1), 65.

CHAPPELL, L. H.; THOMSON, A. W.; BARKER, G. C.; SMITH, S. W. G. Dosage, timing, and route of administration of cyclosporin A and nonimmunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporin A and cyclosporin C against *Schistosoma mansoni* in vivo and in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, p. 1567-1571, 1987.

CHINEMBIRI, T. N., DU PLESSIS, L. H., GERBER, M., HAMMAN, J. H., & DU PLESSIS, J. (2014). Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules*, *19*(8), 11679-11721.
CHIPPAUX, J. P.; LE HESRAN, J. Y.; GARCIA, A.; BRASSEUR, P. Recent studies have reported significant toxicity of artemisinin and its derivatives for schistosomula in various *Schistosoma* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, p. 1-2, 2003.

CHISTSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, p. 41-51, 2000.

CIDDIO, M., MARI, L., GATTO, M., RINALDO, A., & CASAGRANDI, R. (2015). The temporal patterns of disease severity and prevalence in schistosomiasis. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, *25*(3), 036405.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitol. Res.**, v. 90, p. S3-S9, 2003.
CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 13, p. 659-663, 2000.
CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitol. Today,** v. 14, p. 418-421, 1998.
CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? **Pharmac. Ther.**, v. 68, p. 35-85, 1995.

CLARK, T. E. **Plant molluscicides for snail control in the South African context. Pietermaritzburg.** PhD Thesis, University of Natal. South África, 1994.
CLARK, T. E.; APPLETON, C. C.; KVALSVIG, J. D. Schistosomiasis and the use of indigenous plant molluscicides: a rural South African perspective. **Acta Trop.**, v. 66, p. 93-107, 1997.

CLEMENTE, A. D. **Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolia* Raddi)**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistence in schistosomes. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 162-166, 1993.

COELHO, P. M.; LIMA e SILVA, F. C.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 39, p. 101-106, 1997.

COIMBRA JR., C. E. A.; SANTOS, R. V.; SMANIO-NETO, L. **Potencial endêmico da esquistossomose para o Estado de Rondônia, Brasil.** Revista de Saúde pública, n. 18, p. 510-5, 1984.

CONCEIÇÃO, M. J.; ARGENTO, C. A.; CORRÊA, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 375- 380, 2000.

COLES, G. C.; MUTAHI, W. T.; KINOTI, G. K.; BRUCE, J. I.; KATZ, N. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 782-785, 1987.

COMITÉ OMS. D'experts. (OMS, Série de reppotrs techniques; 830). Geneve: Organization Mondiale de la santé, 1993.

CÓRDOBA, M. A. M. Avaliação da atividade citotóxica in vitro dos extratos vegetais de Pseudobrickellia brasiliensis (Spreng) RM King & H. Rob, Miconia ferruginata DC e Ageratum fastigiatum (Gardn.) RM King sobre células tumorais Jurkat. 2017.

CORREA, L. R., & PARAENSE, W. L. (1971). Susceptibility of Biomphalaria amazónica to infection with two strains of Schistosoma mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *13*(6), 387-90.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 125-6, 1978.

COSTA, C. D. S., ROCHA, A. M. D., SILVA, G. S. D., JESUS, R. P. F. S. D., & ALBUQUERQUE, A. C. D. (2017). Programa de Controle da Esquistossomose: avaliação da implantação em três municípios da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Saúde em Debate, 41, 229-241.

COSTA, E. V. S. (2018). Avaliação da atividade esquistossomicida do lapachol e análogos.

COUTINHO, I. H. I. L. S.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U.; STAHLKE JUNIOR, H. J.; AGULHAM, M. A.; BACHLE, E.; CAMARGO, P. A. M.; PIMENTEL, S. K.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, p. 49-54, 2006.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Produtos naturais: Uma fonte contínua de novos medicamentos. Biochim. Biophys. Acta. 2013; 1830: 3670–95.

FREIRES, I. A., ALVES, L. A., JOVITO, V. C., & CASTRO, R. D. (2011). Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolia* (Aroeira) sobre cepas do gênero Candida. *Revista Odontológica do Brasil Central*, *20*(52).

DEGASPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PARDO, M. R. M. **Atividade antimicrobiana de *Schinus terebentifolia* Raddi.** Cienc Agrotec; 29 (3): 617–22, 2005.

DIAS, L. C.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M.; MAFRA, G. L. A human strain of Schistosoma mansoni resistant to schistosomicides. **Rev. Saude Publica**, v. 12, p. 110, 1978.

DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to Praziquantel: is there a problem? **Trens R. Soc. Trop. Méd.**, v. 96, p. 465-469, 2002.

DOENHOFF, M. J.; KIMANI, G.; CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. **Parasitol. Today,** v. 16, p. 364-366, 2000.

DVORKIN-CAMIEL, L., & WHELAN, J. S. **Tropical american plants in the treatment of infectious diseases.** Journal of dietary supplements, *5*(4), 349-372, 2008.

EISSA, M. M.; EL-AZZOUNI, M. Z.; AMER, E. I.; BADDOUR, N. M. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, p. 235-242, 2011.

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

ERASMUS, D. A. A. comparative study of the reproductive system of mature, immature and unisexual female *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 67, p. 165-183, 1973.
ERASMUS, D. A. A. Strutural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. **J. Chem. Eco.**, v. 12, p. 1755-1764, 1986.

ESTEVÃO, L. R. M., MEDEIROS, J. P. D., SIMÕES, R. S., ARANTES, R. M. E., RACHID, M. A., SILVA, R. M. G. D., ... & EVÊNCIO-NETO, J. **Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolia* Raddi).** Acta Cirurgica Brasileira, *30*(4), 289-295, 2015.

ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro; INCA. 2016 122
FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistance schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 83-88, 1994.

FAVRE, T. C., PEREIRA, A. P. B., BECK, L. C., GALVÃO, A. F., & PIERI, O. S. **School-based and community-based actions for scaling-up diagnosis and treatment of schistosomiasis toward its elimination in an endemic area of Brazil.** Acta tropica, 2015.

FAVRE, T. C., PIERI, O. S., BARBOSA, C. S., BECK, L. **Avaliação das Ações de Controle da Esquistossomose Implementadas entre 1977 E 1996 na Área Endêmica de Pernambuco, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 36 (6) 569-576, 2001.

FARIAS, L. M. M., RESENDE, A. P. C., SABROZA, P. C. SOUZA-SANTOS, R. **Análise Preliminar da Esquistossomose no período de 1999 a 2003.** Caderno de Saúde pública; 23 (1): 235-239, 2007.

FARIA, R. X., ROCHA, L. M., SOUZA, E. P. B. S. S., ALMEIDA, F. B., FERNANDES, C. P., & SANTOS, J. A. A. (2018). Molluscicidal activity of Manilkara subsericea (Mart.) dubard on Biomphalaria glabrata (Say, 1818). *Acta tropica*, *178*, 163-168.

FENWICH, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, p. 577-582, 2006.

FENWICH, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, R.; TODD, M. H. Drug for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 509-515, 2003.

FERNANDES, H. F. Bioensaio de extratos vegetais em *Biomphalaria glabrata* exposta a *Schistosoma mansoni*. 2015. PhD Thesis. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

FERREIRA L. A., LIMA F. L., ANJOS M. R., COSTA J. M. L. **Forma tumoral encefálica esquistossomótica: apresentação de um caso tratado cirurgicamente**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical *31*: 89-93, 1998.

FRANCESCHINI, G.; TERRIBILE, D.; MAGNO, S.; FABBI, C.; D'ALBA, P.F.; CHIESA, F.; DI LEONE, A.; MASETTI, R. Update in the treatment of locally advanced breast câncer: a multidisciplinar approach. **European Review Medical and Pharmacological Sciences**, v.11, p.283-289, 2007.

GASPARINI, J.R.; SARAIVA, R.A. Tratamento de dor em paciente com tumor sacral inoperável. Relato de caso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.2, p.252-260, 2004.

GERHARDT, N. (2018). *AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS FRUTOS DE GENÓTIPOS DE AROEIRA (Schinus Terebinthifolius Raddi) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO* (Master's thesis, Universidade Federal do Espírito Santo).

GILBERT, B., & FAVORETO, R. (2011). *Schinus terebinthifolia* Raddi.

GOMES, E. C. S. et al. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. BMC infectious diseases v. 14, n. 1, p. 101, 2014.

GONÇALVES JF, COUTINHO A, SANTANA W, BARBOSA CS. **Esquistossomose aguda de caráter episódico na Ilha de Itamaracá, PE.** Caderno da Saúde Pública *7*: 424-425, 1992.

GONÇALVES, M.P.M; MAÊDA, J.M; ABREU, H.S; SILVA. S.P; SOUZA, G.R. Propagação Vegetativa da Aroeira (*Schinus terebinthifolia*) por Alporquia. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 363-365, 2007.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.
GRYSEELS, B.; MBAYE, A.; DE VLAS, S. J.; STELMA, F. F.; GUISSE, F. VAN LIESHOUT, L.; FAYE, D.; DIOP, M.; LY, A.; TCHUEM-TCHUENTE, L. A.; ENGLES, D.; POLMAN, K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 864-873, 2001.

MARTÍNEZ GUERRA, M. J., LÓPEZ BARREIRO, M., MOREJÓN RODRÍGUEZ, Z., & RUBALCABA, Y. (2000). Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolia* Raddi (copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *5*(1), 23-25.

GURARIE, D., YOON, N., LI, E., NDEFFO-MBAH, M., DURHAM, D., PHILLIPS, A. E., & KING, C. H. **Modelling control of Schistosoma haematobium infection: predictions of the long-term impact of mass drug administration in Africa.** Parasites & vectors, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2015.

HAGAN, P., & GRYSEELS, B. (1994). Schistosomiasis research and the European Community. *Tropical and geographical medicine*, *46*(4 Spec No), 259-268.
INOBAYA, M. T., OLVEDA, R. M., CHAU, T. N., OLVEDA, D. U., & ROSS, A. G. (2014). Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Research and reports in tropical medicine*, *2014*(5), 65.

HOTEZ, P. J.; ENGELS, D.; FENWICH, A.; SAVIOLI, L. Africa is desparate for praziquantel. **Lancet.**, v. 376, p. 496-498, 2010.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J.L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 214-218, 1996.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL- INCAPER. **Aroeira: um nicho de mercado em expansão na economia capixaba**. Texto disponibilizado em 06 julh. 2016.

IYER, A.K.; SINGH, A.; GANTA, S.; AMIJI, M.M. Role of integrated cancer nanomedicine inovercoming drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1784–1802.

JAIN, M. K.; YU, B. Z.; ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A; OSTRANDER, R. L.; RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inihibitor of secreted phospoliapase A2 from berries of *Schinus terebinthifolia*. **Phytochemistry**. v. 39, p. 537-547, 1995.

JATSA, H. B., DE JESUS PEREIRA, C. A., PEREIRA, A. B. D., NEGRÃO-CORRÊA, D. A., BRAGA, F. C., MACIEL, G. M., ... & TEIXEIRA, M. M. (2015). In vitro evaluation of Sida pilosa Retz (Malvaceae) aqueous extract and derived fractions on Schistosoma mansoni. *Pharmacology & Pharmacy*, *6*(08), 380.

JUDD, W. S. CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. DONOGHUE. **Sistemática vegetal**: **um enfoque filogenético**/ tradução: André Olmos Simões et al. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KHALED, F.; EL-MASSRY; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T.; J. Agric. Food Chem. v.57, p.5265, 2009.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 381-387, 1973.

KATZ, N. Chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, v. 14, p. 1-70, 1977.

KATZ, Naftale; PEIXOTO, Sérgio Viana. **Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. **Esquistossomose, xistosa, barriga d'água**. Revista Ciência e Cultura, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses, 2018.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**.10ª ed., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.1088, 2010.

KAWANO, T. **The principal stages of the embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae): Pratical guide**. Malacologia, 34: 33-40, 1992.

KEISER, J.; CHOLLET, J.; XIAO, S. H.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y.; UTZINGER, J.; TANNER, M. Mefloquine-an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e350, 2009.

KING, C. H. (2009). Toward the elimination of schistosomiasis. *New England Journal of Medicine, 360*(2), 106-109.

KIROS G, ERKO B, GIDAY M, MEKONNEN Y. Laboratory assessment of molluscicidal and cercariacidal effects of Glinus lotoides fruits. BMC Res Notes. 2014. doi:10.1186/1756-0500-7-220.

KUMMAR V, ABBAS A, FAUSTO N. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: WB Saunders; 2004.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. 10ª ed., WB Saunders, China, p.260, 2010.

KUSUZAKI, K.; MURATA, K.; MATSUBARA, T.; SATONAKA, H.; WAKABAYASHI, T.; MATSUMINE, A.; UCHIDA, A. Acridine Orange could be na innovative anticancer agente under photon energy. **International journal of experimental and clinical patophysiology and drug research**, v.21, p.205-214, 2007.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz v. 105, n. 4, p. 422–435, 2010.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolia* Raddi. (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v. 17, n. 2, p. 67-89, 2004b.

LEYTON, V., HENDERSON T. O., MASCARA, D. **Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersiconesculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae).** Iheringia Ser Zool *95*: 213-216; 2005.

LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J.; SOUTHGATE, V. R. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1227–1235, 2001.

LIMA, N. M. F., DOS SANTOS, A. F., PORFÍRIO, Z., GOULART, M. O., & SANT'ANA, A. E. G. (2002). Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and Tilapia nilotica. *Acta tropica*, *83*(1), 43-47.

LINSUKE, S. et al. High Prevalence of *Schistosoma mansoni* in Six Health Areas of – Kasansa Health Zone, Democratic Republic of the Congo: Short Report. PLoS Neglected Tropical Diseases v. 8, n. 12, p. e 3387, 18 dezember. 2014.

LIOTTA, L.A.; KOHN, E.C. Progress the microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v.411, p.375-379, 2001.

LIU, S.Y.; SPORER, F.; WINK, M.; JOURDANE, J.; HENNING, R.; LI, Y.L.: Ruppcl. **A Anthraquinones ín *Rhettrn palmatum* and *Rumex deníatus* (Poiygonaceae). And phorbol esters in *Jatroplta curcas* (Euphorbiaceae) «with molluscicidal activity against the schistosome veclor snail *Oncomelania. Biomphalaria* and *Bulinus.*** Tropical Medicine /nl Health 2: 179-188. 1997.

LOMAX, M.E.; FOLKES, L.K.; NEIL, P.O. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevnce to radiotherapy. **Clinical oconlogy**, p.1-8, 2013.

LOPES, T. C., GONÇALVES, J. D. R. S., SOUZA, N. S., MORAES, D. F. C., DO AMARAL, F. M. M., & ROSA, I. G. **avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de caryocar brasiliense camb**. Cadernos de Pesquisa, *18*(3), 2011.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; COR- REA, M. A. C.; HENRIQUES, G. S.; SAN- TOS, O. J.; CESCHIN, P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos, **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.2, 2006.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLERDGE, S. J. Principles of cancer therapy: Oncogene and Non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p. 823-837, 2009.

LORENZI, H**. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4.ed. v.1. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Vol. 1, 5° edição. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A**. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

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.

MANDEFRO, B., MERETA, S. T., TARIKU, Y., & AMBELU, A. (2017). Molluscicidal effect of Achyranthes aspera L. (Amaranthaceae) aqueous extract on adult snails of Biomphalaria pfeifferi and Lymnaea natalensis. *Infectious diseases of poverty*, *6*(1), 133.
MARKMAN, J.L.; REKECHENETSKIY, A.; HOLLER, E.; LJUBIMOVA, J.Y. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1866–1879.

MARTORELLI, S.B.F; PINHEIRO, A.L.B; SOUZA, I.A; HIGINO, J.S; BRAVO, F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira) a 30% em orabase – estudo "*In vivo*". **Int J Dent**, v. 10, n.2, p. 80-90, 2011.

MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Review article number 6: **Plants moluscicidas.** Phytochemistry *24*: 639-652, 1985.

MARTINS, M. C. B. et al. Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of Biomphalaria glabrata (Say, 1818). PLoS ONE v. 9, n. 11, p. e111102, 6 nov. 2014.

MARTINS-MELO, F. R. et al. **Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000– 2011.** International Journal for Parasitology v. 44, n. 14, p. 1055–1062, dez. 2014.

MARTINEZ, M. J., GONZALEZ, A. N., BADELL, B. J. **Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (copal).** Revista Cubana de Plantas Medicinais.1(3):37-9, 1996.

MCLEOD, H.L. Cancer pharmacogenomics: Early promise, but concerted effort needed. **Science**, v.339, p.1563-1566, 2013.

MCCLLOUGH, F. S., GAYRAL, P., DUNCAN, J., CHRISTIE, J. D., 1980. **Molluscicides in schistosomiasis control.** *B World Health Organ 58*: 681-689, 1980.

MELO, A. L; COELHO, P. M. Z. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004, cap. 22, p. 193-212. Schistosoma mansoni e a doença.

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R; GRANDI, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B.; ZANI, C. L. **Screening of Asteraceaí" (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity**. Memoria do Instituto Osvaldo Cruz 94:411-412. 1999.

MENDES, M.P.M.F.; OLIVEIRA, T.K.B.; SARMENTO, D.B.; DO Ó, N.P.R; GADELHA, N.C. *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde**, v. 10, n.5, p. 23 - 27, 2015.

MENDES, R. J. D. A. (2019). Análise temporal e espacial da esquistossomose mansoni no estado do Maranhão no período de 2007 a 2016.

MEYER B. N., FERRIGNI N. R., PUTNAM J. E., JACOBSEN L. B., NICHOLS D. E., MCLAUGHLIN J. L. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med 45:* 31-34.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Negligenciadas: Estratégia do Ministério da Saúde.** Departamento de Ciências e Tecnologia, Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Revista da Saúde Pública; 44 (1): 200-2, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle de Esquistossomose (PCE). Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2. Ed. – Brasília, Ministério da Saúde 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. - (Ministério da Saúde). **Pacto pela Saúde**. Portaria Nº 399, de fevereiro de 2006.

MISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório de Atividades do Projeto de Vigilância e Monitoramento de Endemia do convênio entre ENSP/FIOCRUZ e SVS/MS.** Brasília: Secretária se Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2005.

MOAHMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. Sativa seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Mem. Inst. Osvaldo Cruz,** v. 100, p. 205-211, 2005.

MOLASSIOTIS, A.; FERNANDEZ-ORTEGA, P.; PUD, D.; OZDEN, G.; SCOTT, J.A.; PANTELI, V.; MARGULIES, A.; BROWALL, M.; MAGRI, M.; SELVEKEROVA, S. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 655–663.

MONÉ, H. et al. Human Schistosomiasis in the Economic Community of West African States. Advances in Parasitology. [S.l.]: Elsevier, 2010. 71 v. p. 33–91. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X10710010>. Acesso em: 16 set. 2015. 978-0-12-381512-5.

MORAES, C. N. et al. **Correlação de Criadouros de Biomphalaria Sp., Hospedeiro do Schistosoma Mansoni, em Área de Baixa Infraestrutura Sanitária no Distrito de Mosqueiro, Belém, Pará.** Hygeia v. 10, n. 18, p. 216–233, 2014.

MORAES, J. D. (2011). Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em Schistosoma mansoni (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

MØLGAARD, P.; NIELSEN, S. B.; RASMUSSEN, D. E.; DRUMMOND, R. B.; MAKAZA, N.; ANDREASSEN, J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 257-264, 2001.

MOURA, A. P. G. (2012). Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica do óleo essencial dos frutos de Xylopia langsdorffiana St. Hil. & Tul. (Annonaceae).

MOURELLE, J. A. F.; CAO, M. C. F. L.; RODRÍGUEZ, F. M.; GUTIÉRREZ, Z. P. Actividad antiinflamatoria del *Schinus terebinthifolius*, (copal) en ratas. **Revista Cubana de Farmacia**. v. 27, n. 2, p. 139-144, 1993.

MUNIZ, C. **Levantamento da malacofauna límnica e aspectos ecológicos de focos de esquistossomose em Ana Dias, Vale do Ribeira-SP.** Universidade de SP, Faculdade de Saúde Pública, 2007.

NALUGWA, A.; JØRGENSEN, A.; NYAKAANA, S.; KRISTENSEN, T. K. **Molecular phylogeny of *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae) reveals the presence of three species complexes in the Albertine Rift freshwater bodies.** International Journal of Genetics and Molecular Biology, 2(7), p. 130-139, 2010.

NASCIMENTO, C. A. A., ARÉVALO, E., AFONSO-NETO, I. S., BESSA, E. C. A., & SOARES, G. L. G. **Efeito do extrato aquoso de folhas de Allamanda cathartica L. (Apocynaceae) sobre Bradybaena similaris (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório.** Revista Brasileira de Zoociência, *8*(1), 77-82. 2006.

NAPOLEÃO, T.H., GOMES, F.S., LIMA, T.A., SANTOS, N.D., SÁ, R.A., ALBUQUERQUE, A.C., PAIVA, P.M., 2011. Termiticidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva against Nasutitermes corniger and its mechanisms. Int. Biodeterior. Biodegradation. 65(1), 52-59. http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.05.015.

NDAMBA, J.; NYAZEMA, N.; MAKAZA, N.; ANDERSON, C.; KAONDERA, K. C. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, p. 125-132, 1994.

NERES, R. C. B. et al. **Caracterização epidemiológica dos casos de esquistossomose no município de Feira de Santana, Bahia–2003-2006**. Revista Baiana de Saúde Pública v. 35, p. 28, 2011.

NETO, L. et al. **Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil.** Cadernos de Saúde Pública v. 29, n. 2, p. 357–367, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana** 13ª ed. São Paulo: Editora Athene, 2016.
NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. J. Nat. Prod. 66, 1022–1037.

NICOLINI, J. V.; PUGET, F. P.; MAZZA, M. G. G. Avaliação da eficiência de extração de óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-vermelha) pelos métodos de

hidrodestilação e arraste a vapor. **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2009.

NICK A., RALI T., STICHER O. 1995. Biologial screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. J Ethnopharmacol 49: 147-156.
OLIVEIRA, E.C., PAUMGARTTEN, F.J.R., 2000. Toxicity of Euphorbia milii latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 342–350.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; SANTOS, R.B.; REIS, F.O.; MATSUMOTO, S.T.; BISPO, W.M.S.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolia* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de PlantasMedicinais**, v.15, n.1, p.150-157, 2013.

Organización Mundial de la Salud 1991. E*mpleo inócuo de plaguicidas*: 29 p.

ORGANIZAÇÃO MONDIALE DE LA SANTÉ (OMS). **Lutte contre les helmintíases chez les enfants d'âge scolaire.** Guia à l'intention des Responsáveis des programas de De Lutte Deuxième, 2011.

PADILHA, R. J. R. (2013). *Caracterização ultraestrutural dos componentes bioquímicos da região tegumentar e subtegumentar de verme adulto macho de Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907)* (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).

PALUMBO, M.O.; KAVAN, P.; MILLER, W.H.; PANASCI, L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAK, M.; JAGOE, R.T.; BATIST, G. Systemic câncer therapy: achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in phamacology**, v.4, p.1-9, 2013.

PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em Australorbis glabratus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 53: 277-284 1972.

PARAENSE, W. L., & CORREA, L. R. (1973). Susceptibility of Biomphalaria peregrina from Brazil and Ecuador to two strains of Schistosoma mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *15*(3), 127-30.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. **Observations on the morfology of Australorbis glabratus.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 53, n. 1, p. 52-77, 1955.

PAREDES, H. et al. **Spatial pattern, water use and risk levels associated with the transmission of schistosomiasis on the north coast of Pernambuco, Brazil.** Cadernos de Saúde Pública v. 26, n. 5, p. 1013–1023, 2010.

PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M.A.B. Panorama atual da esquistossomíase
733 no mundo. **Ver. Bras. Cienc. Farm.**, v.37, p.123-135, 2001.

PÉLA, J.J. **Caracterização agronômica da aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) no município de São Mateus, no Estado do Espírito Santo**. 2013, 74f.Tese (Doutorado em

Produção Vegetal) – Programa de Pós- Graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.

PEREIRA FILHO, A. A., FRANÇA, C. R. C., OLIVEIRA, D. S. D. S., MENDES, R. J. D. A., GONÇALVES, J. D. R. S., & ROSA, I. G. (2014). Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of Jatropha gossypiifolia Linnaeus, 1753 on Biomphalaria glabrata (Say, 1818). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *56*(6), 505-510.

PINTO, C., ALMEIDA, A. F. **Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni.** Memória do Instituto Oswaldo Cruz *40*: 291-311 1994.

PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L. The Pampulha reservoir remains a potential urban focus of schistosomiasis mansoni in Brazil: changes in the occurrence patterns of *Biomphalaria* species and a new record of the parasite. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 46, n. 4, p. 478–483, 8 ago. 2013.

PORDEUS, L. C., AGUIAR, L. R., QUININO, L. R. D. M., & BARBOSA, C. S. (2008). A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, *17*(3), 163-175.

RAGHAVAN, N. **Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and postexposure to miracidia of *Shistosoma mansoni.*** Molecular and Biochemical Parasitology 126: 181-191, 2003.

RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. I. Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and imune therapy of cancer. **Cancer Immnunol Immunoyher**, v.62, p.405-410, 2013.

RASO, P., & NEVES, J. (1965). Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansoni através de punções biópsias. *Anais Fac. Med. Univ. Minas Gerais*, *22*, 147-165.

RASO, G.; VOUNATSOU, P.; MCMANUS, D.P.; N'GORAN, E.K.; UTZINGER, J. A Bayesian approach to estimate the age-specific prevalence of Schistosoma mansoni and implications for schistosomiasis control. International Journal for Parasitology, v. 37, n. 13, p. 1491–1500, 2007.

REY, L. (1991). Parasitologia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *33*(2), 104-104.

REY L. 2001. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos 763 ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2011.

ROCHA, M. E. L. (2018). Ação do ácido salicílico nas características morfofisiológicas e bioquímicas em mudas de Schinus terebinthifolius Raddi. E Cedrela fissilis VELL.

ROLLEMBERG, C. V. V. et al. **Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helmintos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 44, p. 91–96, 2011.

ROGERS, S. H.; BUEDING, E. Hycanthone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science**. v. 172, p. 1057-1058, 1971.

ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.,** v. 346, p. 1212-1220, 2002.

RUAS, F. G. Seleção de genótipos, manejo eperfil químico de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi.) no Estado do Espírito Santo. **Dissertação de mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2016.

RUIZ A. L. T. G., MAGALHÃES E. G., MAGALHÃES A. F., FARIA A. D., AMARAL M. C. E., SERRANO D. R., ZANOTTI-MAGALHÃES E. M., MAGALHÃES L. A. 2005. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salin*a e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev Bras Farmacogn 15:* 98-102.

SÁ, J. L. F.; SIQUEIRA, W. N.; SILVA, H. A. M. F.; SANTOS, M. L. O.; SANTOS, F. T. J.; SILVA, L. R. S.; CABRAL, D. L. V.; BEZERRA, I. C. F.; SOARES, L. A. L.; MELO, A. M. M. A. "Evaluation of molluscicidal activity of A*nadenanthera colubrina* extracts on adult mollusc and embryos of the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)", Scientia Plena, Volume 12, pp.1-9 (2016).

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

SANDERSON, L.; BERTLETT; A.; WHITFIEKD, P. J. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **J. Helminthol.**, v. 76, p. 241-247, 2002.

SANTANA, J. S., SARTORELLI, P., LAGO, J. H. G., & MATSUO, A. L. (2012). Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*.

SANTANA, J. S., SARTORELLI, P., GUADAGNIN, R. C., MATSUO, A. L., FIGUEIREDO, C. R., SOARES, M. G., ... & LAGO, J. H. G. (2012). Essential oils from Schinus terebinthifolius leaves–chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. *Pharmaceutical Biology*, *50*(10), 1248-1253.

SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. Ban. SARTORI, C.V; DELLACASSA, E; MOYNAS, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolia* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul.

Revista Brasileira de Farmacognosia- Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.20, n.2, p.154-159, 2010.

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. **Nat. Med.**, v. 14, p. 407-412, 2008.

SAVAGE, S. J.; WINGO, M.S.; HOOPER, H.B.; SMITH, M.T.; KEANE, T.E. Pathologically confirmed port site metastasis after laparoscopic radical prostatectomy: case report and literature review. **Urology**, v. 70, p.1222.e9-11, 2007.

SCHELL, S. C. **How to know the trematodes.** Dubuque: WMC Brown, 1970.
SELVA, T. M. G. **Estudos Eletroquímicos da Lausona (2-hidroxi-1, 4-Naftoquinona) e derivados da 1, 4-Naftoquinona com atividade moluscicida** (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado-Universidade Federal Rural de Pernambuco), 2010.

SERAPÍÃO, M. S.; SERAPIÃO, C.; KISS, A.; APPEL, H. **Diagnóstico intraoperatório de esquistossomose mansônica cerebelar pseudotumoral.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 45(1), p. 69-73, 2009.

SINGH SK, YADAV RP, SINGH A. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh. India J Appl Toxicol. 2010. doi:10.1002/jat. 1498.

SIQUEIRA, J. M. D., BOMM, M. D., PEREIRA, N. F. G., GARCEZ, W. S., & BOAVENTURA, M. A. D. **Estudo fitoquímico de Unonopsis lindmanii Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a Artemia salina Leach.** 1998 Quím Nova, 21(5), 557-559

SILVA, L. B. L. **Preparação e avaliação biofarmacêuticas de formas semi-sólidas da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolia* Raddi)**. 1999. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

SILVA, H. A. M. F., SIQUEIRA, W. N., SÁ, J. L. F., SILVA, L. R. S., MARTINS, M. C. B., AIRES, A. L., ... & SILVA, N. H. (2018). Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta tropica*, *178*, 97-102.

SILVA, H. A. M. F., & PEREIRA, E. (2019). Toxicological effects of Ramalina aspera (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and Schistosoma mansoni cercariae. *Acta Tropica*.

SILVA, C. L. P. A. C. et al. **Ação moluscicida de Moringa oleifera LAM sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) hospedeiro intermediário do Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) e efeitos ecotoxicológicos em organismos aquáticos não alvo**. [s. l.: s. n.], 2013.

SILVA, K. E. R. et al. Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada v. 33, n. 1, p. 9–16, 2012.
SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde v. 20, n. 3, p. 327–336, set. 2011.

SOARES, D. G. D. S. Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tinturade *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira). **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 10, n. 3, p. 365-370, 2010.

SOUZA, P. A.; VENTURNI, N.; MACEDO, R. L. G.; ALVARENGA, M. I. N., SILVA, V. F. Estabelecimento de espécies arbóreas em recuperação de área degradada pela extração de areia. **Cerne**, v.7, n.2. p.43-52, 2001.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG**. 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012.

SOUZA, D.C.L; SILVA-MANN, R; FERREIRA, R.A; GOMES, J.L, ALMEIDA, T, S; OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, G.S; GOIS, I.B. Produção de frutos e características morfofisiológicas de *Schinus terebinthifolia* Raddi., na região do baixo São Francisco, Brasil. **Revista Árvore**, v.37, n.5, p.923-932, 2013.

SOUZA, L. R. M., GARGIONI, C., SIQUEIRA, R. V., SILVA, R. M., PINTO, P. L. S., & KANAMURA, H. Y. (2017). Aspectos epidemiológicos da esquistossomose em área do sudoeste de Minas Gerais, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz, 76, e1730.

SPARG, S. G.; Van STANDEN, J., JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, v. 1-2, p. 209-214, 2000.
STAMP, N. (2003). Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly review of biology*, *78*(1), 23-55.

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. **Lacent Infect. Dis.**, v. 6, p. 411-425, 2006.

STIREWALT, M.A. Schistosoma mansoni: cercária to schistosomule. **Adv. Parasitol.**, v. 12, p. 115-182, 1974.

TAKAHASHI, F. Y., EDUARDO, J. M., KAWANO, T., KATO, M. J., & OHLWEILLER, F. P. **Efeitos de Extratos de Piperaceae em Biomphalaria Glabrata (Mollusca: Planorbidae).** Revista Saúde-UnG, 4(1 Esp), 66, 2010.

TLAMÇANI, Z, & ER-RAMI, M. **Schistosomiasis control: moroccan experience compared to other endemic countries.** Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 4, n. 4, p. 329-332, 2014.

TRAEBERT, J., SCHNEIDER, I. J. C., COLUSSI, C. F., & DE LACERDA, J. T. (2013). Burden of disease due to cancer in a Southern Brazilian state. *Cancer epidemiology*, *37*(6), 788-792.
TOPHAM, C.H.; TAYLOR, S.S.; Mitosis and apoptosis: how is the balance set? **Current opnion in cell biology**, v.25, p.1-6, 2013.

USDA, UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. **The plants database**. Greensboro: National Plant Data Team. NC 27401-4901 USA. Disponível em:https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=SCTE Acesso em: 10 março. 2017.

UTZINGER, J.; XIAO, S.; N'GORAN, E. K.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1549-1562, 2001a.

UTZINGER, J.; XIAO, S.; KEISER, J.; CHEN, M.; ZHENG, J.; TANNER, M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 1841–1860, 2001b.

UTZINGER, J., KEISER, J., SHUHUA, X., TANNER, M., & SINGER, B. H. (2003). Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(5), 1487-1495.

UTZINGER, J., RASO, G., BROOKER, S., DE SAVIGNY, D., TANNER, M., ØRNBJERG, N., ... & N'GORAN, E. K. (2009). Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology*, *136*(13), 1859-1874.

VAN NASSAUW, L.; TOOVEY, S.; VAN OP DEN BOSCH, J.; TIMMERMANS, J. P.; VERCRUYSSE, J. Schistosomicidal activity of the antimalarial drug, mefloquine, in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 6, p. 253-258, 2008.

VIEIRA, M. N., COSTA, F. N., LEITÃO, G. G., GARRARD, I., HEWITSON, P., IGNATOVA, S., ... & JERZ, G. **Schinus terebinthifolia scale-up countercurrent chromatography (Part I): High performance countercurrent chromatography fractionation of triterpene acids with offline detection using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, *1389*, 39-48, 2015.

VIRMOND, M. C. L. **Pesquisa em Doenças Negligenciadas: Um Desafio Presente.** Salusvita. Vol.29 no3, Editorial negle 2010.

WARREN, K. S. (1972). The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(3), 417-432.

WERNECK, G. L., HASSELMANN, M. H., & GOUVÊA, T. G. **Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil**. Ciência da Saúde Coletiva, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.

WILLIAM, S., BOTROS, S., ISMAIL, M., FARGHALLY, A., DAY, T. A., BENNETT, J. L. Praziquantelinduced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantelresistant infections. **Parasitology**, v. 122, p. 63–66, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. Fact sheet. World Health Organization, Geneva. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis (accessed May 14, 2018).

WHO (A) - World Health Organization. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiases: numbers of people treated in 2017. **Weekly Epidemiological Record**, N. 50, 2018. p. 681–692.

WHO, 2010. Schistosomiasis. Wkly Epidemiol. Rec. 85 (18), 158–164.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014 Schistosomiasis. Fact sheet 115. **World Health Organization, Geneva.** http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/ (accessed April 20, 2014).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Schistosomiasis.** Fact sheet 115. World Health Organization, Geneva, 2014**.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelminthic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers.** Geneva: World Health Organization; 2006.

WROBLEWSKI, L.E.; PEEK, R.M. Helicobacter pylori in gastric Carcinogenesis: Mechanism. **Gastroenterology clinics of North America**, v.42, p.285-298, 2013.
www.who.int/cancer/en/ acessada outubro, 2017.
www.who.int/cancer/treatment/en/, acessada outubro, 2017.
www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento, acessada outubro, 2017.
www.who.int/cancer/tratament, acessada outubro, 2017.

YOU, J.S.; JONES, P.A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two sides of the same coin? **Cancer cell**, v.22, p.9-20, 2012.

ZHANG, Y.; MACARTHUR, C.; MUBILA, L.; BAKER, S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC Med.**, v. 8, p. 67, 2010.

www.portal.saude.pe.gov.br/programas-e-acoes/controle-de-doencas/projeto-sanar-doencasnegligenciadas

XIAO, S.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; CHEN, M.; ZHENG, J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Trop.**, v. 82, p. 175-181, 2002.

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

166