



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA (PPGM)

SÉRGIO DOURADO MAGALHÃES FILHO

**SCREENING FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*
DO EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS FRESCAS DE
RHIZOPHORA MANGLE L.**

Recife

2017

SÉRGIO DOURADO MAGALHÃES FILHO

**SCREENING FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO
EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS FRESCAS DE
RHIZOPHORA MANGLE L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia (PPGM) do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia. Área de Concentração: Morfologia e Métodos Clássicos e Avançados.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Co-orientador: Andre de Lima Aires

Recife

2017

Catalogação na Fonte:
Teresa Cristina Moreira de Lucena, CRB-4/ 1419

Magalhães Filho, Sérgio Dourado

Screening fitoquímico e avaliação esquistossomicida in vitro do extrato metanólico de folhas frescas de *Rhizophora Mangle* L.. / Sérgio Dourado Magalhães Filho. – 2017.

52 f. : il., fig., tab.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Coorientador: André de Lima Aires

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Morfotecnologia, Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. *Rhizophora mangle* 2. Farmacologia 3. Esquistossomose I. Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso (orient.) II. Aires, André de Lima (coorient.) III.

Título

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-015

SÉRGIO DOURADO MAGALHÃES FILHO

**SCREENING FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO
EXTRATO METANÓLICO DE FOLHAS FRESCAS DE
RHIZOPHORA MANGLE L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia-PPGM do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia. Área de Concentração: Morfologia e Métodos Clássicos e Avançados.

Orientador: Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Co-orientador: Andre de Lima Aires

Aprovada em: 31/07/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Mônica Pessoa de A. Albuquerque/UFPE/LIKA

Prof^a. Dra. Ivone Antônia de Souza/UFPE

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira/UFPE

A Deus, minha família, esposa e aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é um pai grandioso, piedoso e amável, fonte de minha força e vida.

Agradeço a minha amada esposa por me ajudar a superar meus limites, sempre comigo, sempre ao meu lado, sempre me estimulando e apoiando com minhas ideias de grandeza. Eu te amo minha flor.

Agradeço a minha família por sempre me apoiar e sentir orgulho pelo esforço empregado para trilhar esse caminho, em especial, minha mãe Márcia, Tia Neusa e Tia Deia.

Ao meu grande amigo Antônio Henrique (Toninho) por me escutar e ajudar nas dificuldades, por me acompanhar tantas vezes nas viagens de ida e volta de Caruaru a Recife, obrigado por não dormir na vaga do passageiro e por não me deixar dormir ao volante!

Agradeço ao professor doutor Jeymesson pelas horas de dedicação e empenho em me ensinar.

A todos os meus colegas que viajaram comigo para o Instituto Nacional do Semiárido (INSA) e, em especial ao, ate então, mestrando Ricardo Sérgio que de forma gratuita e corajosa me ajudou com toda a burocracia da UFPE.

A Vanessa e sua equipe no INSA, em Campina Grande, Paraíba.

A minha turma de mestrado, que com o nosso coleguismo e amizade, tornaram dias de trabalho duro em algo muito divertido.

A todo o corpo docente do programa de pós-graduação em Morfotecnologia, em especial, aos professores Jacinto Costa, Ricardo Yara e Antônio Carlos, que em minha qualificação me abriram os olhos.

Ao meu Sensei e amigo Adeildo Gomes que sempre me deu forças e estímulo para prosseguir na luta.

Ao Prof. Dr. Andre Ayres e sua equipe no Laboratório de Esquistossomose Experimental do LIKA/UFPE e no Departamento de Medicina Tropical/UFPE

Muito obrigado!

RESUMO

A busca por novos fármacos vem sendo amplamente discutida, a fim de investigar alternativas terapêuticas para o controle e tratamento da esquistossomose, doença parasitária crônica, causada por parasitas do gênero *Schistosoma* que coloca em risco cerca de 780 milhões de pessoas e infecta cerca de 240 milhões a cada ano. *Rhizophora mangle* L., conhecida como mangue vermelho, é uma das espécies encontradas nos manguezais e é usada na medicina popular no tratamento de processos infecciosos, antiparasitários, inflamatórios e cicatrizantes, sem relatos de efeitos colaterais ou nocivos ao ser humano. Neste estudo, foi realizado o screening fitoquímico e a avaliação da atividade esquistossomicida (*in vitro*) do extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle*. A coleta do material vegetal foi realizada no manguezal do município de Itamaracá-PE, Brasil, e o extrato foi preparado a partir de 1kg de folhas, utilizando o equipamento Pulverisette 14 Classic Line (Fritsch), produzido em extrator Dionex ASE 350 (Thermo Scientific) pelo método Low Bubble Point de extração de fluxo constante, utilizando o metanol como solvente, sob pressão por hidrogênio (H₂) e em duplicata. O perfil fitoquímico foi realizado através da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC do inglês – High Performance Liquid Chromatography), que passou por análise no Detector de Arranjo de Diodo (DAD) por um tempo total de 27 min. Casais de vermes foram recuperados de camudongos previamente infectados com cepas de cercárias de *S. mansoni* e incubados em meio RPMI-1640 suplementado e expostos as concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL do extrato. Os vermes foram monitorados a cada 24hs durante 120hs para avaliação da motilidade e mortalidade. A análise fitoquímica mostrou que o composto principal do extrato é um flavonóide do tipo rutina. Na avaliação da atividade esquistossomicida do extrato de *R. mangle* houve 100% de descasamento de vermes em todas as doses testadas. A dose de 400µg / mL mostrou redução de 75% na atividade motora, com movimento apenas nas extremidades, ausência de peristaltismo e movimento de ventosas. Portanto, o principal metabólito secundário encontrado no extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle* L. apresentou características cromatográficas de um composto do tipo rutina e o extrato apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* em casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: Atividade esquistossomicida. *Rhizophora mangle*. Extrato metanólico. Screening fitoquímico.

ABSTRACT

The search for new drugs has been widely discussed in order to investigate therapeutic alternatives for the control and treatment of schistosomiasis, a chronic parasitic disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*, which puts at risk about 780 million people and infects about 240 million each year. *Rhizophora mangle* L., known as a red mangrove, is one of the species found in mangroves and is used in folk medicine in the treatment of infectious, antiparasitic, inflammatory and healing processes, without reports of side effects or harmful to humans. In this study, the phytochemical screening and the evaluation of schistosomicidal activity (in vitro) of the methanolic extract of fresh leaves of *R. mangle* were carried out. The material was collected in the mangrove of Itamaracá-PE, Brazil, and the extract was prepared from 1 kg of leaves using the Pulverisette 14 Classic Line (Fritsch) equipment produced in Dionex ASE 350 (Thermo Scientific) by Low Bubble Point method of constant flow extraction, using methanol as solvent, under pressure by hydrogen (H₂) and in duplicate. The phytochemical profile was performed through High Performance Liquid Chromatography (HPLC), which was analyzed by the Diode Array Detector (DAD) for a total time of 27 min. Worm casts were recovered from previously infected *S. mansonicercariae* and incubated in supplemented RPMI-1640 medium and exposed to the 25, 50, 100, 200 and 400 µg / mL doses of the extract. The worms were monitored every 24 hours for 120 hours for evaluation of motility and mortality. Phytochemical analysis showed that the main compound of the extract is a routine type flavonoid. In the evaluation of the schistosomicidal activity of the extract of *R. mangle* there was 100% of worm mismatch in all the doses tested, the dose of 400 µg / mL showed a reduction of 75% in the motor activity, with movement only in the extremities, absence of peristalsis and movement of suction cups. Therefore, the main secondary metabolite found in the methanolic extract of fresh leaves of *R. mangle* L. presented chromatographic characteristics of a rutin-like compound and the extract showed schistosomicidal activity in vitro in couples of adult worms of *Schistosoma mansoni*.

Key words: Schistosomicidal activity. *Rhizophora mangle*. Methanolic extract. Phytochemical screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Distribuição mundial das diferentes espécies de <i>Schistosoma</i> que apresentam importância na medicina humana | 16 |
| Figura 2 - Vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> | 18 |
| Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> | 19 |
| Figura 4 - Miracídeo, forma evolutiva de <i>Schistosoma mansoni</i> | 20 |
| Figura 5 - Ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> | 20 |
| Figura 6 - Estrutura química do OxamniquinaePraziquantel | 21 |
| Figura 7 - <i>Rhizophora mangle</i> | 26 |
| Figura 8 - Mapa do Manguezal de Vila Velha (7° 40' de latitude sul e 34° 50' longitude oeste) – Pernambuco, Brasil | 31 |
| Figura 9 - Análise cromatográfica de extrato metanólico de <i>R. mangle</i> | 36 |
| Figura 10 - Efeitos <i>in vitro</i> do extrato metanólico de folhas de <i>R. mangle</i> na viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> | 41 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste de Motilidade no Praziquantel e no Extrato de *R. mangle*

38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

DAD - Detector de Arranjo de Diodo

WHO - World Health Organization

PZQ - Praziquantel

INSA - Instituto Nacional do Semiárido

EMFRm - Extrato Metanólico de Folhas Frescas de *Rhizophora mangle*

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------------------|--------------------------|
| Kg | Kilograma |
| H₂ | Hidrogênio |
| µg/mL | Micrograma por Mililitro |
| min | Minutos |
| % | Por cento |
| hs | Horas |
| g | Gramas |
| ml | Mililitro |
| L | Litro |
| ° | Grau |
| v/v | Volume por volume |
| nm | Nanômetro |
| µl | Microlitro |
| ± | Mais ou menos |
| = | Sinal de igual |
| mm | Milímetro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Epidemiologia | 14 |
| 2.2 Biologia e Ciclo Evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> | 15 |
| 3 TRATAMENTO | 20 |
| 4 MANGUEZAIS | 22 |
| 4.1 <i>Rhizophora mangle</i> | 24 |
| 4.1.1 Distribuição Geográfica | 25 |
| 4.1.2 Uso Medicinal | 26 |
| 4.1.3 Metabólitos Secundários | 27 |
| 5 OBJETIVOS | 29 |
| 5.1 Objetivo Geral | 29 |
| 5.2 Objetivos Específicos | 29 |
| 6 MATERIAIS E METODOLOGIA | 30 |
| 6.1 Material Vegetal | 30 |
| 6.2 Preparação do Extrato Metanólico de <i>Rhizophora mangle</i> (EMFRm) | 30 |
| 6.3 Estudo Fitoquímico do EMFRm | 31 |
| 6.4 Considerações Éticas, Animais e Infecção dos Camundongos | 32 |
| 6.5 Susceptibilidade <i>in vitro</i> do <i>S. Mansoni</i> | 32 |
| 7 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA | 33 |
| 7.1 Escores de Motilidade e Taxa de Sobrevida | 33 |
| 7.2 Ensaio de Viabilidade | 33 |
| 8 RESULTADOS | 34 |
| 8.1 Estudo Fitoquímico | 34 |
| 8.2 Atividade Esquistossomicida | 36 |
| 9 DISCUSSÃO | 40 |
| 10 CONCLUSÕES | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |
| ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL VEGETAL | 50 |
| ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) | 51 |

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por parasitas do gênero *Schistosoma* que coloca em risco cerca de 779 milhões de pessoas distribuídas em 78 países e territórios, onde existem cerca de 239 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2016). Destas, 20 milhões desenvolvem a forma crônica da infecção e cerca de 280.000 evoluem para óbito todos os anos. Este cenário fez a esquistossomose ser incluída na lista de doenças negligenciadas que precisam ser urgentemente controladas (GRIMES et al. 2014; WHO, 2016). Somado ao grande impacto socioeconômico e a ausência de vacina segura e eficaz, atualmente, o tratamento e controle da esquistossomose é realizado apenas com Praziquantel (PZQ) (CHEN et al., 2016). Além disto, a literatura relata uma possível resistência e/ou tolerância de cepas, tanto de laboratório, quanto selvagens de *Schistosoma* resistentes ao PZQ (GABA et al. 2014). Assim, há uma necessidade urgente na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas de origem sintética, semi-sintética e natural com potencial esquistosomicida.

Nosso grupo de pesquisa vem explorando o potencial biológico, farmacológico e fitoquímico da *Rhizophora mangle*, também conhecida como mangue vermelho. Sendo o manguezalum ambiente biodiverso e hostil, diversas adaptações em seus processos fisiológicos resultam na síntese de metabólitos secundários, compostos orgânicos que além de auxiliarem na proteção contra predadores e ações adaptativas ao ambiente, que são responsáveis por suas propriedades biológicas e farmacológicas (CHEN et al., 2015; CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; EDREVA et al., 2008; REYES;).

Folhas, caule, raízes e frutos de *R. mangle* apresentam amplo uso na medicina popular, sendo empregada em tratamentos de diabetes, hemorroidas, dor de dente e problemas estomacais (CARNEIRO et al. 2010). Estudos comprovaram atividades em úlceras gástricas (DE-FARIA et al., 2012, PERERA et al., 2010), anti-inflamatória (MARRERO et al., 2006), cicatrizante (FERNANDEZ et al., 2002), antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2006), antidiarréico (WENDEL et al., 2013) e antimicrobiana (MELCHOR et al., 2001). Além de apresentar eficácia contra larvas de *Anophelesgambiae* (TARIWARI, 2014) e *Trichostrongylus spp* (ALEMÁN et al., 2011), mosquito *Culexquinquefasciatus* e *Anophelesstephensi* (NAGARAJAN, 2015).

Assim, nosso objetivo é contribuir com a pesquisa de novas alternativas terapêuticas no controle da esquistossomose, ao explorar o potencial esquistosomicida *in vitro*, do extrato metanólico de folhas frescas de *Rhizophora mangle*, bem como, elucidar a fitoquímica deste extrato empregando o HPLC.

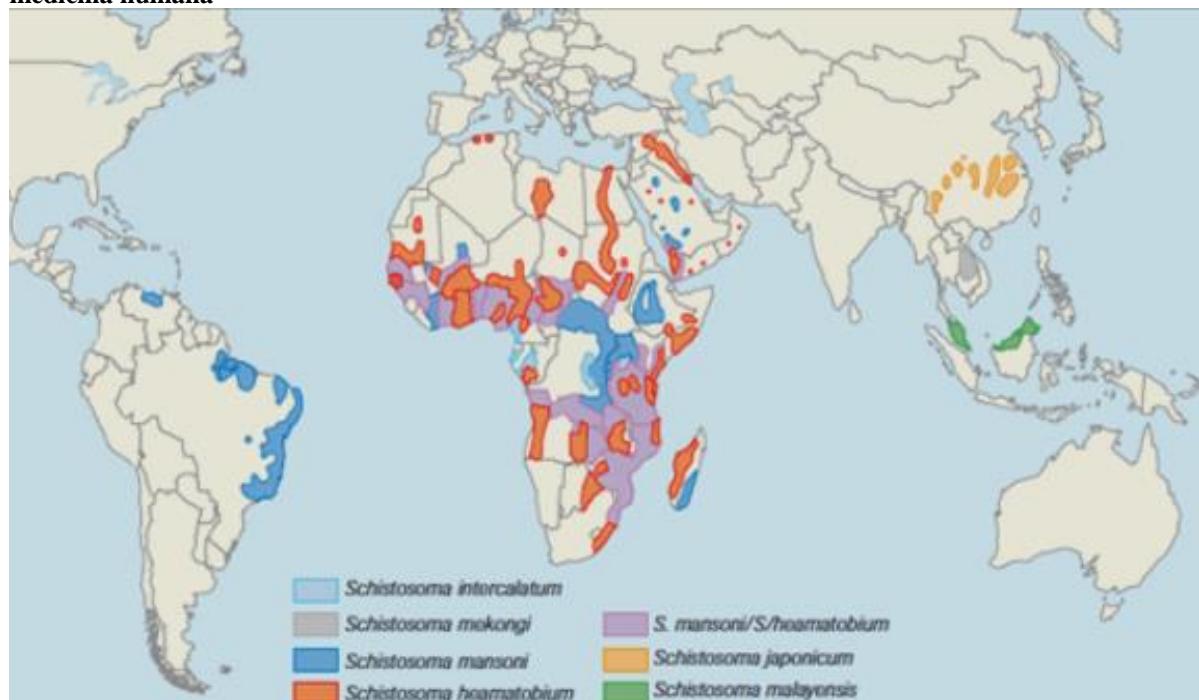
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

As esquistossomíases são doenças causadas por trematódeos do gênero *Schistosoma*. A figura 1 ilustra a distribuição geográfica das diferentes espécies que apresentam importância na medicina humana: *S. japonicum* encontrado na China e no Sudeste Asiático; *S. mansoni* nas populações da África, Arábia e América do Sul; *S. haematobium* encontra-se restrito a população da África e da Arábia; *S. intercalatum* é encontrado na África Ocidental e Central; *S. mekongi* é encontrado apenas no Delta do rio Mekong, localizado no sudeste da Ásia; e *S. malayensis* é restrito a Malásia. Destas, os *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* são as principais espécies responsáveis por transmitir a infecção no mundo (GRYSEELS, 2012).

A esquistossomose é uma preocupação global em saúde pública, principalmente nas áreas endêmicas, por debilitar homens e mulheres durante seus anos mais produtivos. Atingem as populações mais pobres que vivem em condições de ausência ou escasso saneamento e que favoreçam a transmissão e não têm acesso a cuidados adequados ou medidas eficazes de prevenção (ENGELS et al., 2002).

Figura 1 - Distribuição mundial das diferentes espécies de *Schistosoma* que apresentam importância na medicina humana



Fonte: Engels et al (2002)

Em escala global, uma a cada trinta pessoas é portadora de esquistossomose, o que corresponde a cerca de 239 milhões de infectados que estão distribuídos em 78 países e territórios, onde 779 milhões de pessoas estão em constante risco de infecção. Dos infectados, 20 milhões desenvolvem a forma crônica e 280.000 pessoas evoluem para óbito todos os anos (GRYSEELS, 2012; ROLLINSON et al., 2013; WHO, 2012). O *S. mansoni* é uma das espécies mais importante, devido à sua ampla distribuição geográfica e ao número de infectados, e é a única espécie encontrada nas Américas (REY, 2008b). No Brasil, país mais afetado nas Américas, estima-se que em 2010 quase 7 milhões de pessoas estavam infectadas (ROLLINSON et al., 2013). As áreas endêmicas mais importantes compreendem o norte do Maranhão e as regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, grande parte dos Estados de Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais e na Zona Serrana do Espírito Santo (REY, 2008b). Em Pernambuco, estado com maior taxa de prevalência e incidência, um quarto de sua área tem prevalência acima de 25%.

2.2 Biologia, Ciclo Evolutivo e Patogenia do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* é um animal complexo, incluído no filo Platyhelminthes e classe Trematoda que vêm a milhares de anos co-evoluindo com seus hospedeiros mamíferos e caramujos (VAN HELLEMOND et al., 2006). É endoparasita, com simetria bilateral, corpo não segmentado, desprovidos de sistema circulatório, esquelético ou respiratório; o sistema digestório é incompleto terminando em fundo cego, e apresenta dimorfismos sexual (REY, 2008a).

Os vermes adultos são vermes macroscopicamente visíveis, os machos medem aproximadamente 1 cm de comprimento por 0,11 cm de largura, de cor branca, com o corpo achatado dorsoventralmente, quando acasalado, apresenta-se enrolado de maneira a formar um tubo longitudinal conhecido como canal ginecóforo, onde a fêmea fica albergada. A fêmea que tem o corpo cilíndrico, mais fino e mais longo que o do macho, mede de 1,2 a 1,6 cm de comprimento por 0,016 cm de diâmetro em média, é mais escura e acinzentada (REY, 2008c).

Figura 2 - Vermes adultos de *Schistosoma mansoni*



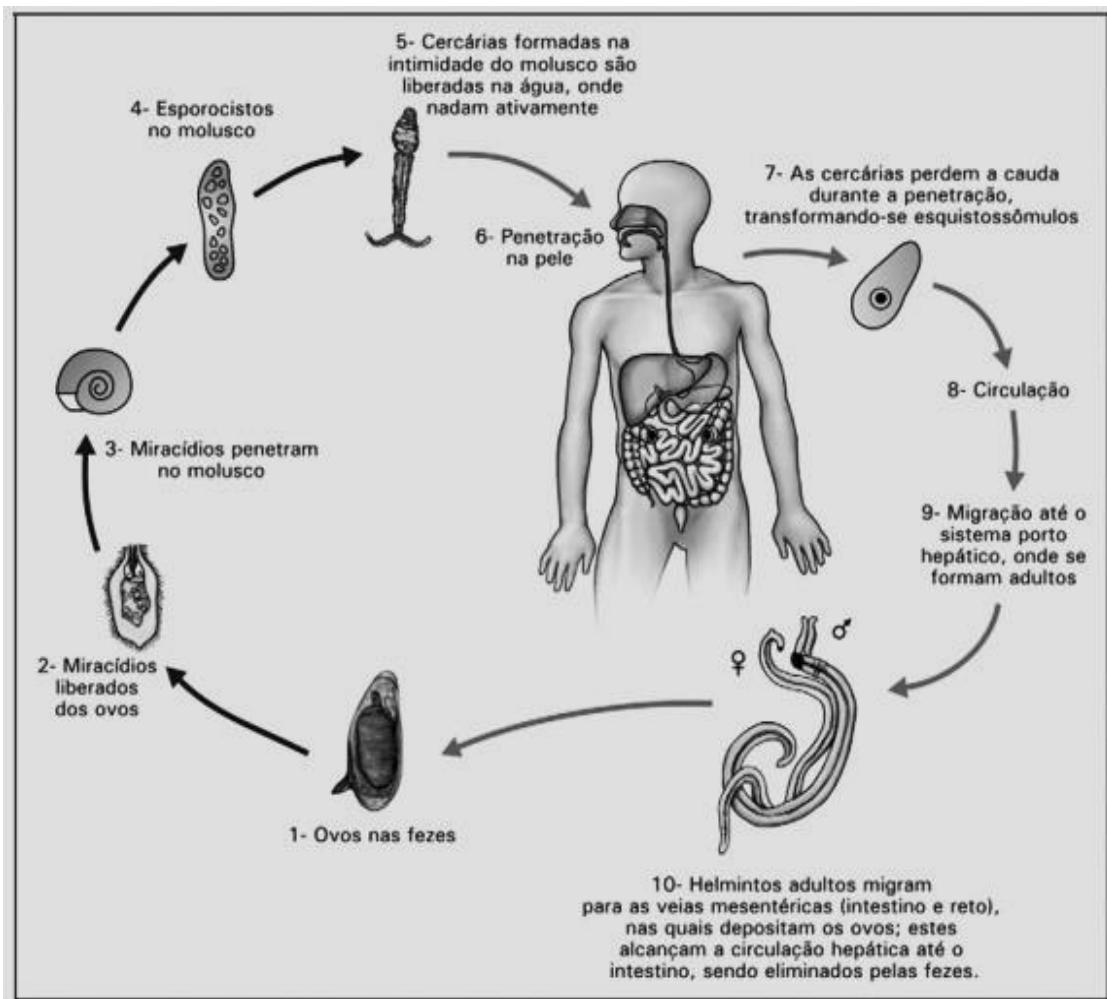
Fonte: <http://www.thiswormyworld.org/worms/what-are-they>

Os casais alojam-se em vênulas terminais do plexo mesentérico inferior, que drenam a parede do intestino grosso, especialmente o reto e o colón sigmoide. Os vermes se alimentam de células sanguíneas e globulinas, e os detritos são regurgitados no sangue humano. O metabolismo anaeróbico serve principalmente para os movimentos dos chistosoma masculino e a produção de ovos das fêmeas (GRYSEELS, 2012). Seus ovos são eliminados junto com as fezes e caracteriza-se pela presença de um espículo lateral e o miracídeo em seu interior, sua casca é bastante rígida e também porosa, permitindo a liberação de substâncias produzidas pelo embrião e também à entrada de nutriente. (REY, 2008c).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo e necessita de dois hospedeiros, o intermediário são moluscos que pertencem ao gênero *Biomphalaria* e as espécies *Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata* são as responsáveis em manter o ciclo no Brasil, e o definitivo, homem e pequenos roedores (MACHADO-SILVA et al., 2008). Apresentam diferentes formas evolutivas, sendo duas de forma livre temporária, miracidios e cercárias, encontradas nos rios, lagos e córregos – responsáveis pela infecção dos hospedeiros intermediários e definitivos, respectivamente (REY, 2008c).

A figura 3 ilustra o ciclo evolutivo do *S. mansoni*. Os ovos eclodem ao entrar em contato com a água e luminosidade, liberam a forma larvária ciliada denominada miracídio.

Figura 3 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Souza et al (2011)

Os miracídios nadam ativamente, e quando encontram um caramujo se aderem e penetram em seu tegumento (Figura 4). No interior do caramujo, há a formação de uma membrana com células germinativas de esporocisto primário. Após o rompimento da membrana, os esporocistos primários são liberados, e continuam crescendo até se diferenciarem e formarem esporocistos secundários nas glândulas digestivas do hospedeiro e a diferenciação em cercárias. Após cerca de 35 dias de infecção, os caramujo, quando expostos a luz e calor são capazes de liberar cercárias (COELHO, 1970; MACHADO-SILVA et al., 2008; REY, 2008c). No hospedeiro definitivo, o corpo cercariano penetra a pele, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, através da corrente sanguínea ou linfática são levadas ao pulmão. Nesse órgão, os esquistossômulos permanecem um período, onde passam por transformações, tornando-se mais delgados e compridos, depois são levados para os vasos intra-hepáticos através da circulação geral (CARVALHO et al, 2008). Cerca de 35 dias após a infecção, os vermes adultos acasalam e migram para as veias mesentéricas, onde a fêmea

inicia a postura de ovos. Diariamente, cerca de 400 ovos são liberados por casal. Metade dos ovos são embolizados via corrente sanguínea e depositado especialmente no fígado. A outra metade atravessa o epitélio intestinal e é eliminada junto com as fezes (Figura 5). Esses ovos em coleções hídricas reiniciam o ciclo biológico (QUACK et al., 2010).

Figura 4 - Miracídeo, forma evolutiva de *Schistosoma mansoni*



Fonte: icb.usp.br

Figura 5 – Ovos de *Schistosoma mansoni*



Fonte: Fiocruz – 2008

A infecção por *S. mansoni* pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica, ambas podendo ser sintomáticas, oligossintomáticas ou assintomáticas (PRATA; COURAS, 2008). A gravidade das manifestações clínicas está envolvida com a linhagem do parasita, a carga parasitária, as condições fisiológicas tanto do parasita como do hospedeiro definitivo e a frequência com que ocorre a re-infecção. O curso da doença depende do tipo das reações locais e gerais, da reação do organismo na fase da invasão, das mudanças ocorridas durante o amadurecimento dos vermes e das reações imunopatológicas provocadas pelo acúmulo de ovos no tecido do hospedeiro, especialmente do tecido hepático intestinal (ANDRADE, 1970; MACHADO-SILVA et al., 2008; REY, 2008d).

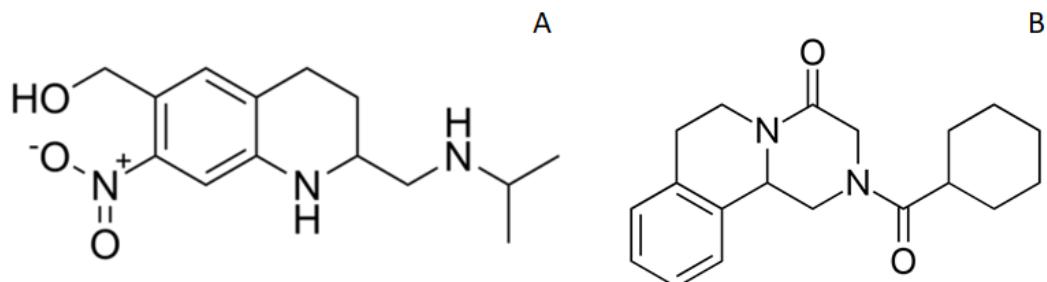
Na fase aguda, os sintomas são decorrentes da penetração das cercárias e migração dos vermes jovens. Observam-se sintomas bem característicos: a dermatite cercariana, a febre Katayama e manifestações pulmonares. A dermatite cercarianavaria, desde um quadro

assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, durando até cinco dias após a infecção. Devido à inespecificidade destes sintomas clínicos na fase aguda da doença, geralmente, são ignorados pelo portador e de difícil diagnóstico na prática clínica, acarretando a cronicidade da infecção. Após esse, começam as complicações da fase crônica, inicialmente caracterizada por: diarreias repetidas, do tipo mucosanguinolenta ou não, e dor abdominal. Durante essa fase o fígado e o intestino são os órgãos mais comprometidos devido ao acúmulo de ovos que estimulam ao seu redor uma resposta imuno inflamatória granulomatosa. Os granulomas na fase inicial são exudativos e ao longo da inflamação ocorre um reparo tecidual fibroso. Este reparo tecidual é irreversível e responsável pela hipertensão portal. No curso da infecção os pacientes podem apresentar ascite e, em quadros mais graves, circulação colateral anómala e varizes esofagianas. Em casos mais raros os pacientes podem apresentar sintomas pulmonares (tais como dispneia e tosse seca) e neurológicos tais como encefalite aguda e vasculite cerebral. Os sinais e sintomas iniciais da doença incluem: dor lombar ou dor em membros inferiores, paraparesia, disfunções urinária e intestinal e impotência, nos homens (GRYSEELS, 2012; PRATA; COURA, 2008; SILVA et al., 2012).

3 TRATAMENTO

A revolução no tratamento quimioterápico ocorreu durante a década de 70, com a descoberta da oxamniquina ([7-nitro-2-[(propan-2-ylamino)methyl]-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl]methanol) (OXA) e do praziquantel (PZQ) (Cyclohexanecarboxamide,N-(2-(3,4-dihydro-1-oxo-2(1H)-isoquinolinyl)-2-oxoethyl)-N-formyl) (Figura 6). Os ensaios clínicos realizados no Brasil mostraram que o tratamento por via oral com o OXA apresentava boa tolerância, baixos efeitos colaterais e índice de cura acima de 60% (KATZ, 2008a). No entanto, OXA se mostrou inativo contra *S. japonicum* e *S. haematobium*, algumas cepas de *S. mansoni* do Leste Africano apresentaram resistência e sua produção foi limitada devido o alto custo (CIOLI et al., 1995).

Figura 6 - Estrutura Química do Oxamniquina e B – Praziquantel



O PZQ comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de levo R (-) e dextro S (+) isômeros. Porém, apenas o enantiomero (-) possui atividade esquistossomicida que em ensaios clínicos apresenta taxas de cura de 80-90% quando administrado por via oral (KATZ, 2008a). O amplo espectro de ação anti-helmíntico, poucos efeitos adversos, baixo custo e sua eficácia em diferentes formas clínicas da esquistossomose, inclusive na forma hepatoesplênica fizeram do PZQ a droga de escolha para o tratamento e controle da esquistossomose (KATZ, 2008a). Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza que o tratamento seja em dose única oral de 50 e 60mg/kg para adultos e crianças, respectivamente.

Ainda não se conhece o exato mecanismo de ação do PZQ, mas acredita-se que a droga atue causando influxo de Ca⁺⁺ ao longo do tegumento dos vermes. Esse mecanismo é capaz de causar contração muscular, espasmo, danos tegumentares e alterações metabólicas no verme adulto. A contração muscular e o espasmo são os primeiros sinais observados, in vitro e in vivo, no verme quando expostos ao PZQ (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003). Assim, os vermes perdem a capacidade de fixação, devido ao relaxamento da ventosa ventral,

e são embolizados para o fígado, onde ocorrem reações inflamatórias, e, em conjunto com outras lesões, culminará com a eliminação dos parasitos. PQZ é capaz de causar vacuolização, bolhas e descamação ao logo do tegumento (AIRES et al., 2014).

Amplamente utilizado por mais de 40 anos, ainda não foi comprovado o desenvolvimento de resistência e/ou tolerância clínica frente PZQ em nenhuma das principais espécies que infectam humanos, mesmo em áreas onde o tratamento tem sido realizado por longos períodos de tempo (BLACK et al., 2009; BOTROS et al., 2005; GUIDI et al., 2010).

No entanto, parasitas com menos sensibilidade ao PZQ foram obtidos em experimentos de seleção artificial em laboratório (FALLON, 1994) e há relatos de redução terapêutica registrados em estudos de campo (DOENHOFF et al., 2002; LIANG et al., 2001; LIANG et al., 2010; MELMAN et al., 2009). Ainda, estudos recentes demonstraram que o tratamento de vermes jovens e adultos com dose subletal de PZQ induzia o aumento da expressão de diferentes proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (KASINATHAN et al., 2010). Até o momento a busca por análogos ativos do PZQ não foram tão eficazes (DONG et al., 2010; LAURENT et al., 2008; RONKETTI et al., 2007), apesar de compostos protótipos para o tratamento da esquistossomose terem sido identificados (SAYED et al., 2008; SIMEONOV et al., 2008).

Nas campanhas de quimioterapia preventiva, uma dose anual de PZQ vem sendo distribuído para crianças em idade escolar ou comunidades inteiras. Mesmo após os excelentes resultados obtidos com as campanhas de tratamento em massa, várias barreiras precisam ser vencidas para eliminar a esquistossomose entre elas: a demanda do PZQ é maior que a quantidade oferecida, a existência de dificuldades na fiscalização e manutenção da periodicidade no tratamento da população durante a realização dessas campanhas que precisam ser realizadas por vários anos, a ausência de uma vigilância pós-intervenção e verificação da interrupção da transmissão efetiva da doença. Além disso, práticas como o controle dos caramujos, o fornecimento de água potável e saneamento básico e higiene, devem estar aliadas para erradicação da esquistossomose. Isso demonstra que a utilização do PZQ tende a aumentar, e, com isso, pode-se acelerar o risco de surgimento de resistência ou tolerância do parasita, por isso, torna-se necessária à aplicação de medidas que em curto prazo aumentem a vida útil do PZQ (BOCKARIE et al., 2013; WOELFLE et al., 2011).

4 MAGUEZAIS

A palavra mangue se refere a um aglomerado de árvores distintivas que sobem de um emaranhado de raízes contorcidas, arbustos e espécies arbóreas que vivem ao longo das margens, rios e estuários nos trópicos e subtrópicos. Os manguezais são extremamente duros. A maioria vive em terra lamaçenta, mas alguns também crescem em areia, turfa e rocha de coral. Eles vivem em água até 100 vezes mais salgada do que a maioria das outras plantas podem tolerar. Prosperam, apesar das inundações duas vezes por dia pelas marés oceânicas; Mesmo se esta água fosse fresca, a inundação sozinha afogaria a maioria das árvores. Crescendo onde a terra e a água se encontram, os manguezais enfrentam o peso das tempestades e furacões oceânicos (ANDREWS et al., 1984).

Existem 80 espécies descritas de manguezais, 60 das quais, vivem, exclusivamente, em costas entre as linhas de maré alta e baixa. Ambiente esse que cobriu três quartos das costas tropicais do mundo, com o Sudeste da Ásia hospedando a maior diversidade. Apenas 12 espécies vivem nas Américas. Variam em tamanho de pequenos arbustos aos gigantes de 60 metros encontrados no Equador, dentro de uma determinada floresta de mangue, diferentes espécies ocupam nichos distintos. Aqueles que podem lidar com imersões da maré crescem no mar aberto, em baías abrigadas, e em ilhas franjas. As árvores adaptadas a solos mais secos e salgados podem ser encontradas mais distantes da costa. Alguns manguezais florescem ao longo das margens dos rios para o interior, desde que a corrente de água doce seja atingida pelas marés oceânicas (BALL, 1998).

Para que os manguezais sobrevivam sob tais condições hostis, um conjunto notável de adaptações evolutivas torna possível. Estas árvores e arbustos surpreendentes lidam com o sal presente na água salgada do mar que pode matar diversas outras variedades de plantas mundo afora, no entanto, os manguezais devem extrair água doce da água do mar que os rodeia. Muitas espécies de mangue sobrevivem filtrando até 90 por cento do sal encontrado na água do mar, à medida que entra em suas raízes. Algumas espécies excretam o sal através das glândulas em suas folhas. Estas folhas, que são cobertas com cristais de sal secos, tendo assim um gosto salgado. Uma terceira estratégia usada por algumas espécies de mangue é concentrar sal em folhas mais velhas ou casca. Quando as folhas caem ou a casca derrama, o sal armazenado vai com elas. (BALL; PIDSLEY, 1995). Outra forma de estratégia de sobrevivência é por acúmulo de água doce, agindo similarmente a plantas do deserto, os manguezais armazenam água fresca em folhas espessas e suculentas. Um revestimento ceroso nas folhas de algumas espécies dos manguezais sela-se na água e minimiza a evaporação.

Pequenos pêlos nas folhas de outras espécies desviam o vento e a luz solar, o que reduz a perda de água através das pequenas aberturas onde os gases entram e saem durante a fotossíntese. Em algumas espécies de manguezais, essas minúsculas aberturas estão abaixo da superfície da folha, longe do vento seco e do sol. A respiração ocorre em uma variedade de maneiras: alguns manguezais desenvolvem raízes que crescem de forma a perfurar o chão denso para fora, como tubos de mergulho. Esses tubos respiratórios, chamados de pneumatóforos permitem que os manguezais lidem com inundações diárias pelas marés. Pneumatóforos absorvem oxigênio do ar, a menos que estejam entupidos ou submersos por muito tempo (BHOSALE, 1994).

Os sistemas radiculares que se erguem sobre a água são uma característica distintiva de muitas espécies de mangue. Essas raízes aéreas assumem várias formas. Alguns são raízes estacas que ramificam e entrelaçam fora do tronco e ramos mais baixos. Outros são as raízes largas, onduladas da prancha que se estendem longe do tronco. Raízes aéreas para ampliar a base da árvore e estabilizar o sistema de raiz superficial no solo macio e solto. Além de fornecer suporte estrutural, raízes aéreas desempenham um papel importante no fornecimento de oxigênio para a respiração. O oxigênio entra em um manguezal através de lenticelas, milhares de poros respiratórios de tamanho celular na casca e raízes. Esses poros fecham firmemente durante a maré alta, impedindo assim manguezais se afoguem. (BUNT; BUNT, 1999).

O nicho de manguezais entre terra e mar levou a métodos únicos de reprodução. Vagens de sementes germinam enquanto na árvore. Então, eles estão prontos para formar raiz quando eles caem. Se uma semente cai na água durante a maré alta, ela pode flutuar e formar raízes, uma vez que encontra solo sólido. Se um broto cair durante a maré baixa, ele pode se estabelecer rapidamente no solo macio de lama antes da próxima maré. Uma semente vigorosa pode crescer até cerca de 0,6m no seu primeiro ano. Algumas espécies de árvores formam caules e raízes longas, em forma de lança, enquanto ainda estão ligadas à planta-mãe. Depois de serem nutridos pela árvore pai por um a três anos, estes brotos podem quebrar. Alguns formam raízes nas proximidades, enquanto outros caem na água e são levados para costas distantes (CLOUGH, 1992).

Os botânicos acreditam que os mangues se originaram no sudeste asiático, mas as correntes oceânicas desde então os dispersaram para a Índia, África, Austrália e as Américas. Como disse Alfredo Quarto, o chefe do Projeto de Ação de Mangue: "Durante os milhões de anos desde que eles existem, os manguezais têm se estabelecido em todo o mundo." Os frutos, sementes e mudas de todos os manguezais. Plantas podem flutuar, e são conhecidos por boiar

ao longo de mais de um ano antes de formar raiz. Em água de mar flutuante, uma plântula fica plana e flutua rapidamente. Mas quando se aproxima de águas mais frescas e salgadas - condições ideais para os manguezais - a plântula fica vertical, de modo que suas raízes apontam para baixo. Após o alojamento na lama, a plântula rapidamente envia raízes adicionais para o solo. Dentro de 10 anos, com as raízes se espalhando e brotando, uma única muda pode dar origem a um mato inteiro. Não são apenas árvores, mas a própria terra que aumenta. A lama recolhe em torno das raízes entrelaçadas do mangue, e às bolsas de lama rasas acumulam-se acima. Da viagem de uma única semente um rico ecossistema pode nascer (CLOUGH, 1984).

4.1 *Rhizophora mangle*

A *Rhizophora mangle* é uma planta cuja folha, caule, raízes e frutos (FIGURA 7) apresentam variados usos na medicina popular, tais como no tratamento de diabetes, diarreia, disenteria, infecções fúngicas, furúnculos, também atuando como antisséptico, no combate à tuberculose, elefantíase, malária, febre e em pequenas contusões (ABDEL-HAMEED *et al.*, 2012; COELHO-FERREIRA, 2009). Destaca-se pela coloração vermelha de seu caule, o que leva a receber o nome de mangue vermelho, e o faz se tornar um dos mangues mais conhecidos dentre todos os presentes nos manguezais, é pertence aos "verdadeiros manguezais", é uma planta forte e resistente capaz de crescer em diferentes climas, pode lidar com as mudanças de umidade, salinidade, ar e temperatura da água e pode durar até um ano flutuando no oceano. Esta característica torna a *R.mangle* apropriada para colonizar territórios enormes e para competir com outras espécies de manguezais (FAO, 2007; LACERDA, 2002; MAIA *et al.*, 2005).

Figura 7 - *Rhizophora mangle*



Fonte: O Autor (2017)

4.1.1 Distribuição Geográfica

Rhizophora mangle é a planta mais difundida nos manguezais em nosso planeta, graças a sua capacidade de colonização, sua vida longa e sementes que viajam por todo o planeta. O manguezal vermelho foi inicialmente espalhado pelo humano para a proteção costeira e aquicultura. Atualmente, *Rhizophora mangle* cresce entre a latitude 25 norte e 35 sul do equador. Países em que está presente: EUA - Flórida, Havaí, Geórgia, Louisiana, Carolina do Norte, Porto Rico, Carolina do Sul, Texas; América Central - Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá; Caribe - Antígua e Barbuda, Bahamas, Barbados, Ilhas Cayman, Cuba, República Dominicana, Haiti, Jamaica; América do Sul - Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Ilhas Galápagos, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela; África Ocidental - Angola, Guiné equatorial, Benin, Gabão, Gâmbia, Gana, Guiné Bissau, Kamerun, Congo, Libéria, Mauretanien, Nigéria, Senegal, Serra Leoa, Togo, Sahara

Ocidental; Oceania - Ilhas Fiji, Polinésia. Os seres humanos introduziram *Rhizophora mangle* para o Havaí, os Estados Unidos e Queensland, na Austrália. *Rhizophora mangle* é a formação de mangue mais comum nas costas do Atlântico e do Pacífico. (UNIVERSITY OF FLORIDA, 2011). As espécies de *Rhizophora* desenvolvem as típicas raízes “estaca”. Estas raízes surgem, a partir do tronco ou ramos do mangue e crescem em direção ao solo onde irá desenvolver um sistema subterrâneo de raiz. Se a mesma raiz chegar a água em vez do solo, irá crescer de forma subaquática em direção ao solo no oceano. Em um recife, por exemplo, a raiz pode segurar e ser enraizada. Uma vez que a ponta da raiz em “palafita” encontra um apoio, pode se propagar com velocidade espantosa para se ancorar ao solo. Estas raízes em “estaca” têm muitas funções, uma das mais importantes é manter o mangue e garantir o seu crescente espaço. As marés são ásperas, as ondas enormes, ventos fortes, tempestades tropicais, tais como tufões e furacões não o fazem fácil para os mangues. (NEWFOUND HARBOR MARINE INSTITUTE, 2011.). Se uma tempestade tropical acontece em áreas de manguezal, são essas plantas às primeiras atingidas e então outras plantas, animais e seres humanos, esta é a razão porque houve apenas danos pequenos em áreas atrás dos mangues durante o tsunami em dezembro 2004. Os manguezais protegem a costa de muitas maneiras. E para garantir seu desenvolvimento e vida nas marés e intempéries é importante para *Rhizophora mangle* desenvolver numerosas raízes. Outra habilidade importante das raízes é permitir a troca de gás em sedimentos pobres em oxigênio. Manguezais muitas vezes crescem em lama que quase não fornecem qualquer oxigênio, e atingem cerca de 5 metros de comprimento e estenderem em um raio de aproximadamente 10 metros em torno do tronco. (UNIVERSITY OF FLORIDA, 2011).

4.1.2 Uso Medicinal

Os extratos de *R. mangle* foram capazes de inibir o crescimento microbiano de duas das três espécies pertencentes a família Enterobacteriaceae. Entretanto, a diferença de atividade contra as enterobactérias parece derivar dos constituintes do extrato vegetal, principalmente do grupo dos taninos (CIMANGA et al., 2002). A afinidade dos polifenóis por proteínas desempenha um importante papel na inativação de enzimas, impedindo o crescimento de alguns micro-organismos. Os polifenóis têm a propriedade de formar complexos com íons metálicos como ferro, vanádio, magnésio, alumínio e cálcio, resultando numa menor disponibilidade de íons para o metabolismo microbiano (HASLAM, 1996).

Foi observado aumento da resposta inibitória com o aumento das concentrações, com a exceção da cepa de *K. pneumoniae* que apresentou maior halo de inibição com o extrato da casca na concentração de 2 mg mL⁻¹. Outro ponto a ser notado ocorreu com a cepa de *P. aeruginosa*, que apesar do aumento da concentração do extrato da casca, não houve alteração nos valores dos halos de inibição, fato que pode estar relacionado ao processo de sinergismo, onde o componente com propriedade antimicrobiana pode ter se agregado a um elemento químico do extrato, beneficiando metabolicamente o crescimento bacteriano ou inibindo a ação antimicrobiana da molécula (DOMROESE et al, 2010)

A concentração inibitória mínima do extrato da folha apresentou o melhor desempenho para inibir o crescimento das cepas Gram-positivas, enquanto o extrato da casca foi mais eficaz para as cepas Gram-negativas. A utilização de formulações de *R. mangle* contra processos infecciosos provocados por *Salmonella* precisam ser melhor estudadas, mas o fato de ter sido encontrada uma boa sensibilidade da bactéria do mesmo gênero utilizada, permite inferir que os extratos são promissores para serem utilizados contra infecções causadas por causada pela bactéria *Salmonella*. O extrato da raiz apresentou à maior CIM (1250-2500 µg mL⁻¹) quando comparado com as outras partes vegetais, indicando que as moléculas bioativas com propriedades antimicrobianas estão distribuídas em maiores concentração na casca e na folha. Os extratos da casca, folha e raiz mostraram diferença significativa ($p=0.0183$) quando comparados entre si, pelo método de Kruskal-Wallis. Os resultados encontrados para os valores da CIM do Cloranfenicol estão de acordo com as normas da Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Na medicina tradicional, *R. mangle* tem sido utilizada para tratamento contra úlceras gástricas (BERENGUER et al., 2006; DE-FARIA et al., 2012; PERERA et al., 2010; ROIG, 1974), efeito antidiarréico (WENDEL et al., 2013), ação antibacteriana (MELCHOR et al., 2001), atividade antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2006) e anti-inflamatória (MARRERO et al., 2006), e também na cicatrização de feridas cutâneas (FERNANDEZ et al., 2002).

4.1.3 Metabólitos Secundários

Os metabólitos são intermediários e produtos do metabolismo, sendo o termo metabólito usado geralmente a moléculas pequenas. Os metabólitos têm várias funções, incluindo combustível, estrutura, sinalização, efeitos estimulantes e inibitórios sobre enzimas, além de ações catalíticas, atividade própria (geralmente como um cofator a uma enzima), defesa e interações com outros organismos. As plantas produzem uma vasta variedade de

compostos orgânicos cuja grande maioria não parece participar diretamente no crescimento e no desenvolvimento (RUBY, 2015).

Essas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, muitas vezes são diferencialmente distribuídas entre as espécies taxonômicas limitadas dentro do reino vegetal (LIDIJA, 2000). A evolução da importância comercial dos metabólitos secundários nos últimos anos resultou em interesse na possibilidade de alterar a produção de metabólitos de plantas bioativas por meio da tecnologia de cultura de tecidos (RUBY, 2015).

Ao contrário dos metabólitos primários, a ausência de metabólitos secundários não resulta em morte imediata, mas sim em longo prazo, no comprometimento da capacidade de sobrevivência, fecundidade ou estética do organismo. E estes também desempenham um papel importante na defesa de plantas contra herbívoros e outras defesas interespécies. Os seres humanos usam esses metabólitos secundários como medicamentos, aromas e drogas recreativas no passado recente (BOURGAUD, 2001).

A rutina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxiflavona-3-rhamnoglucósido) é um flavonóide do tipo flavonol que é generalizado no reino vegetal (HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2014). Kandil et al. (2004), em estudos sobre os polifenóis em *Rhizophora mangle* descobriram que a rutina é um dos mais abundante glicósidos de flavonol nas folhas dessa planta. A rutina tem uma ampla gama de propriedades farmacológicas que foram exploradas na medicina humana e em sua nutrição. A pesquisa atual mostrou seus benefícios farmacológicos multispectrum para o tratamento de várias doenças crônicas, como câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (SHARMA et al., 2013). No extrato metanólico de *R. mangle*, William (1999) isolou e caracterizou o taraxerol e cinnamoylupeol, dois triterpenóides a partir de folhas e caule de *R. mangle*. Estes triterpenos são importantes na proteção das folhas contra herbívoros. A presença de triterpenos possui adjuvância com os efeitos gastroprotetor (PERTINO et al. 2007) e anti-inflamatório (MEDEIROS et al. 2007).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Realizar estudo fitoquímico, empregando o HPLC, e a atividade esquistossomicida *in vitro*, de extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle* (EMFRm) sobre *Schistosoma mansoni*.

5.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle*.
- Identificar presença e ausência de metabólitos secundários no EMFRm empregando HPLC;
- Avaliar a atividade esquistossomicida(*in vitro*) de EMFRm sobre vermes adultos de *S. mansoni* através de:
 - Escores de motilidade;
 - Taxa de sobrevivência;
 - Viabilidade dos vermes.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

Folhas de *R. mangle* L. foram coletadas na fase adulta no período de floração (Janeiro de 2016) no mangue do município de Itamaracá, distrito de Vila Velha estado de Pernambuco – Brasil a $7^{\circ} 40'$ de latitude sul e $34^{\circ} 50'$ longitude oeste (Figura 8) com seleção de folhas verdes, vistosas, de aparência visualmente agradável, com exclusão de folhas machucadas, amareladas, danificadas ou degradadas por pragas ou dano físico aleatório. Uma exsicata encontra-se no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob número UFP. 69.655. A coleta foi autorizada pela Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração de Recursos Hídricos sob autorização CA DRFB No 120/2014 (Anexo A).

Figura 8 - Mapa do Manguezal de Vila Velha ($7^{\circ} 40'$ de latitude sul e $34^{\circ} 50'$ longitude oeste) – Pernambuco, Brasil



Fonte: Google Maps: <https://www.google.com.br/maps/place/Vila+Velha,+Ilha+de+Itamarac> (2017)

6.2 Preparação do Extrato Metanólico de *Rhizophora mangle* (EMFRm)

EMFRm foi preparado no Instituto Nacional do Semiárido (INSA), em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Para a preparação do extrato foi utilizado 1kg de folhas frescas de *R.*

mangle trituradas em equipamento Pulverisette 14 Classic Line (Fritsch) no qual pequenas porções de folhas foram inseridas no equipamento para obter um produto final suficientemente triturado. O extrato metanólico foi produzido a partir do método LowBubble Point de extração de fluxo constante (BEJTLICH, 1996). O material vegetal foi inserido em duplicata no extrator Dionex ASE 350 (ThermoScientific) (40°C) em células de inox (19 células), cada uma com 30 g do triturado e 100 mL do solvente metanol (fase móvel) sob pressão de hidrogênio (H₂). O extrato foi conduzido para recipientes padronizados de 200 mL alocados na bandeja do equipamento, gerando um total de 7,6 L. O extrato metanólico foi conduzido para rotaevaporação em Genevac Rocket TM (Genevac), com temperatura de 40.3°C e temperatura de refrigeração 3.8°C com variação de 1.93°C, passando por ciclos de 1h40min com pressão de 72 mbar e 648 rpm. Cada ciclo gerou metanol recondicionado, o que possibilitou a sua reutilização no processo de produção de extrato, e produzindo também o extrato bruto concentrado (NAGATO et al., 2001). Vários ciclos foram necessários a fim de se obter o extrato mais seco possível e livre do metanol. O extrato metanólico foi submetido à extração líquido-líquido (ELL) para concentração dos metabólitos secundários. Foram utilizados 500 mL do solvente hexano, misturado à mesma quantidade do extrato na proporção de 1:1, v/v, sendo a mistura agitada durante uma hora.

6.3 Estudo Fitoquímico do EMFRm

EMFRm foi submetido à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC do inglês – High Performance LiquidChromatography), no aparelho Infinitely Better (1200 Infinity Series) através do Gradiente Polar 27 minutos, utilizando dois canais (Canal A fase móvel: H₂O com 0,3% ácido acético e Canal B: Acetonitrila) a partir de 0 a 10 min o 1º gradiente – 98-90% do canal A e de 10 a 27 min o 2º gradiente – 90%-15% do canal A, sob um fluxo de 2,4ml/min no tempo total de 27 minutos à 30°C. O extrato (5 µl) foi inserido no InfinitelyBetter sob o comprimento de onda 256 a 365nm. Foi utilizada a coluna C18 (Zorbax SB-C18 AgilentStable Bond Analytical) 4.6x250mm (tamanho da coluna) 5microns (tamanho das partículas), que passou por uma análise por Detector de Arranjo de Diodo (DAD) em um tempo total de 27 min, gerando assim os cromatogramas (ENGELHARDT, 1979).

6.4 Considerações Éticas, Animais e Infecção dos Camundongos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo de número 0006/2016 (Anexo B). Camundongos fêmeas *Swiss webster* (*Mus musculus*) com 30 dias de idade, peso de 30g (± 2 g) foram fornecidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os camundongos (n=10) foram infectados, via percutânea, com 80 cercárias da cepa BH de *S. Mansoni* (OLIVIER; STIREWALT, 1952). A cepa foi mantida no Laboratório de Esquistossomose Experimental do LIKA/UFPE e no Departamento de Medicina Tropical/UFPE, através de sucessivas passagens em *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss*.

6.5 Susceptibilidade *in vitro* do *S. Mansoni*

Sessenta dias após infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os vermes assepticamente recuperados através da perfusão com salina estéril (NaCl a 0.9% w/v) do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos (SMITHERS; TERRY, 1965). Os vermes coletados foram imediatamente transferidos para placas de Petri com meio de cultura RPMI 1640, suplementado com HEPES 20 mM, 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, e lavados duas vezes com este meio. Posteriormente, os vermes foram distribuídos (dois casais por poço) em placas de cultura estéreis com 24 poços de 35mm de diâmetro, contendo 2 mL do mesmo meio suplementado. Em seguida, os vermes foram incubados a 37°C numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes, o EMFRm foi adicionado em concentrações finais de 25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL. As concentrações de *R. mangle* foram baseadas em estudo experimentais que descrevem o emprego de compostos naturais sobre o *S. mansoni* (SANTOS et al., 2014). O grupo Controle negativo 1 foi formado por casais de vermes incubados em RPMI suplementado e no Controle Negativo 2 os casais foram incubados em RPMI suplementado acrescido de 1% de DMSO. O PZQ na dose de 10 μ M empregado como droga padrão, controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata (n=8 casais de vermes por concentração) e repetidos, pelo menos, em duas vezes.

7 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO ESQUISTOSSOMICIDA

7.1 Escores de Motilidade e Taxa de Sobrevida

Microscópio invertido foi empregado para avaliar as condições gerais dos vermes, incluindo alterações na motilidade, no tegumento e na sobrevida. Os vermes foram monitorados a cada 24 horas, durante 5 dias consecutivos. A motilidade e sobrevida dos vermes foram avaliadas, de acordo com os critérios estabelecidos por Aires et al. (2013) e adaptados pelo nosso grupo de pesquisa. Resumidamente, os vermes foram monitorados obedecendo a um escore decrescente de viabilidade em uma escala de 3 a 0. O sistema de pontuação foi o seguinte:

Score 3 = Apresenta movimentos típicos, exibindo ondas peristálticas dos órgãos internos, ventosas em movimento e/ou aderindo ao fundo ou lateral da placa e sem alterações morfológicas,

Score 2 = Apresenta movimento reduzido ao longo de todo o corpo e do peristaltismo e das ventosas (ocasionalmente aderidas),

Score 1 = Atividade motora mínima com movimentos unicamente nas extremidades (porção anterior e/ou posterior), com ausência de peristaltismo, de movimentos das ventosas e não aderidos,

Score 0 = Ausência de movimentos com ou sem alterações na coloração do tegumento.

7.2 Ensaio de Viabilidade

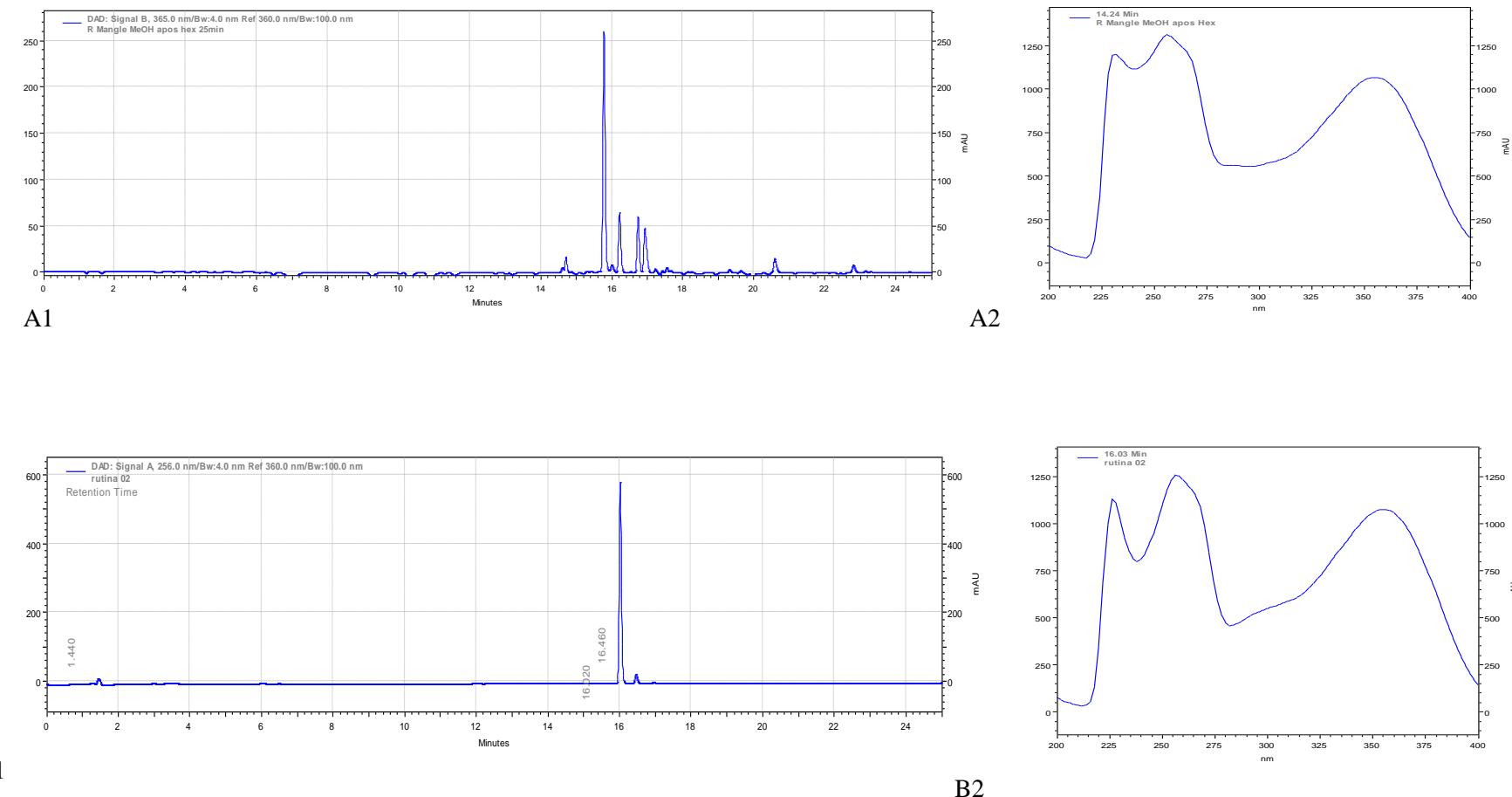
A viabilidade de *S. mansoni*, após tratamento, foi determinada pelo ensaio de citotoxicidade baseado no 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (BERTÃO et al. 2012). Resumidamente, um casal de vermes, por poço, foi distribuído em placas de cultura com 96 poços e adicionado 100 μ L de MTT (5mg/ml em solução salina tamponada com fosfato, PBS) e posteriormente incubados a 37°C durante 30 min. Depois, a solução de MTT foi substituída por 200 μ L de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan e a densidade óptica foi mensurada a 550 nm, num leitor de microplacas (M680, da Bio-RadLaboratories, Inc.). Esse procedimento foi realizado com os vermes do controle negativo e controle positivo nas mesmas condições experimentais. Esse procedimento foi realizado em quadruplicata e repetido duas vezes com vermes.

8 RESULTADOS

8.1 Estudo Fitoquímico

Após a aplicação no Infinitely Better (1200 Infinity Series) dos padrões de amostras de metabólitos secundários reconhecidos e armazenados pelo Instituto Nacional do Semiárido – INSA, em Campina Grande, Paraíba, Brasil, foram gerados tempos de retenção conhecidos e únicos de cada metabólito para a comparação com os tempos de retenção do preparado do EMFRm. A análise do cromatograma apontado pelo Detector de Arranjo de Diodo (DAD) em comprimento de onda 256.0 nm evidenciou um total de 69 tempos de retenção, mostrando diferentes compostos nos seguintes tempos (minutos) de retenção: catequina (polifenol) (10.987), ácido caféico (ác. fenólico) (12.333), geraniína (tanino) (13.880), ácido p-cumárico (ác. fenólico) (14.987), ácido elárgico (polifenol) (16.247), quercetina (flavonoide) (20.767), apigenina (flavonóide) (22.453) e um alto pico de retenção do flavonóide rutina (16.033). O gráfico apontado pelo DAD demonstrou o pico principal num tempo de retenção próximo a da rutina (Figura 9). Fica evidente a semelhança do pico revelado do extrato quando comparado com o padrão do cromóforo Rutina.

FIGURA 9: Análise cromatográfica do extrato metanólico de *R. mangle* (A) e padrão rutina (B). O pico principal do cromatograma do extrato (A1) exibiu um tempo de retenção próximo a da rutina (B1). O cromóforo deste pico principal (A2) também mostra grande semelhança com o padrão rutina (B2).



8.2 Atividade Esquistossomicida

A Tabela 1 mostra os escores de motilidade e taxa de sobrevivência do *S. mansoni* expostos as diferentes concentrações do EMFRm , durante os intervalos de observação do estudo (24, 48, 72, 96 e 120 h).

Tabela 1 - Motilida e taxa de sobrevivência de *S. mansoni* sobre exposição de praziquantel (PZQ) e extrato de *R. Mangle*

Nota: 12 pares de vermes foram utilizados para cada concentração (12 machos e 12 fêmeas).

Escores = 3 Apresenta movimentos típicos, mostrando peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento e/ou aderindo ao lado inferior ou à placa e sem alterações morfológicas. Escores = 2 Apresenta movimento reduzido em todo o corpo e peristaltismo, e as ventosas (ocasionalmente aderidas). Escores 1 = atividade motora mínima com movimentos somente nas extremidades (porção anterior e/ou posterior), com ausência de peristaltismo, movimento das ventosas e não aderidas. Escores 0 = Ausência de movimentos com ou sem alterações na cor do tegumento.

| Grupos | Porcentagem de motilidade dos vermes (%) em pós-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 | | |
| <i>Controle</i> | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | |
| <i>PZQ10 µM</i> | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | |
| <i>Rhizophora</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>mangle</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 400 µg/ml | 75 | 12.5 | 12.5 | | 83.4 | 16.6 | | | 58.3 | 41.6 | | | 66.6 | 33.3 | | | 75 | 25 | | | | |
| 200 µg/mL | | 33.3 | 66.6 | | 20.8 | 79.2 | | | | 100 | | | 45.8 | 54.2 | | | 58.3 | 41.7 | | | | |
| 100 µg/mL | | 20.8 | 79.2 | | | 75 | 25 | | | 100 | | | 33.3 | 66.6 | | | 54.2 | 45.8 | | | | |
| 50 µg/mL | | | 100 | | | 41.7 | 58.3 | | | 50 | 50 | | | 87.5 | 12.5 | | | 100 | | | | |
| 25 µg/mL | | | 100 | | | | 100 | | | | 100 | | | | 41.7 | 58.3 | | | 12.5 | 87.5 | | |

Durante todo o intervalo de observação (120hs), semelhante ao controle incubado em RPMI suplementado (controle negativo 1), casais de *S. mansoni* cultivados em meio RPMI suplementado e acrescido de 1% de DMSO (controle negativo 2) exibiram movimentos corporais e o peristaltismo, dos órgãos internos, típicos e ventosas em constante movimento e/ou aderidas ao fundo ou lateral da placa de cultura. Além disto, os vermes permaneceram acasalados, sem mudanças morfológicas ao longo do tegumento e foi possível visualizar a presença de ovos nos poços de cultura (escore 3). Após 24hs de incubação, PZQ causou 100% de mortalidade. Neste grupo, não visualizamos nenhum movimento peristáltico (órgãos internos) ou corporal (ao longo do tegumento) e os vermes estavam escurecidos e fortemente encurvados (escore 0). A mortalidade ocorreu ainda com os vermes pareados (casais) e foi possível observar extensas alterações ao longo do tegumento que foi tempo dependente.

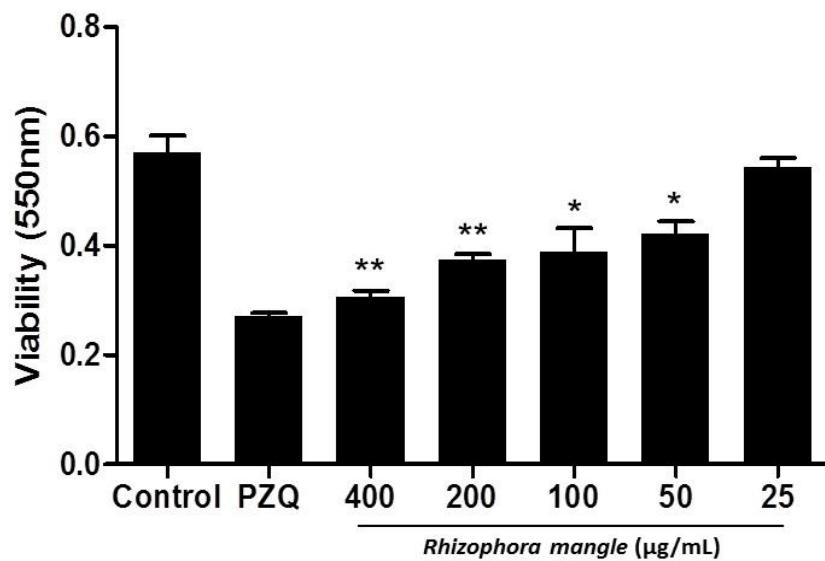
O EMFRm, foi capaz de alterar a motilidade e causar desacasalamento nos tempos iniciais do experimento. Logo após, 24hs de incubação, a dose de 400 $\mu\text{g/mL}$ causou 75% de redução na atividade motora, com movimentos unicamente nas extremidades (porção anterior e/ou posterior), ausência de peristaltismo e movimento das ventosas, que não estavam aderidas (escore 1) e 100% estavam desacasalados. Nesta mesma dose a mortalidade de 58% e 75% foi assinalada em 72hs e 120hs, respectivamente. Nas outras doses, após 48hs, visualizamos vermes com reduzido movimento peristáltico, ao longo do corpo e das ventosas (ocasionalmente aderidas) (escore 2), acompanhadas de processos de desacasalamento que foi dose-tempo-dependentes ao longo do experimento.

Na dose de 25 $\mu\text{g/mL}$ 100% dos vermes permaneceram em escore 3 até 72hs de incubação, apresentou-se mais agitados que o grupo controle, e os casais estavam em processo de desacasalamento. Após 120hs 87,5% dos vermes evoluíram para o escore 2 e todos estavam desacasalados. Já na dose de 50 $\mu\text{g/mL}$ além do desacasalamento 100% dos vermes alcançaram escore 1 no fim do experimento. Após 72hs de incubação todos os vermes exibiram escore 1 nas doses de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Nestas mesmas doses, a mortalidade foi iniciada após 96hs de incubação e 54,2 e 58,3% de mortalidade foi alcançada em 120hs, respectivamente.

Ao fim do experimento, 120hs, a viabilidade do *S. mansoni* frente ao EMFRm, foi avaliada através do ensaio com MTT. DMSO não interferiu na viabilidade celular de casais de *S. mansoni* uma vez que a formação de cristais de formazan foi semelhante entre os grupos controle 1 e controle 2. Com relação à viabilidade celular (Figura 10), todas as doses do extrato mostraram efeito dose-dependente na redução de formazan quando comparadas ao controle 1, com redução de 48% e 36% nas doses de 400 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Essas mesmas doses apresentaram comportamento semelhante à droga padrão (Controle positivo PZQ).

Figura 10 - Efeitos *in vitro* do extrato metanólico de folhas de *R. mangle* na viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*.

Os casais de vermes adultos foram tratados com as amostras em diferentes concentrações por 120 h, e a viabilidade foi medida usando o teste de MTT e a leitura de redução de corante de formazan e registrado a 550 nm. Os controles dos casais foram incubados em meio RPMI 1640 e adicionados de 1,5% de DMSO. O Praziquantel (PZQ, 10 μ M) foi utilizado como grupo controle positivo. A viabilidade foi expressa como média \pm desvio padrão dos valores de absorvância para cinco experimentos. * $P < 0,001$, ** $p < 0,0001$ em comparação com o controle.



9 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a apresentar resultados do screening fitoquímico do EMFRm coletadas no nordeste brasileiro através de HPLC, além de investigar a atividade esquistossomicida frente a casais de *S. mansoni*.

Corroborando com nosso estudo, Sánchez et. al. (1998) ao avaliarem o extrato aquoso de cascas secas de *R. mangle* coletadas em Cuba, destacaram também a presença de polifenóis, representados em sua maioria por taninos, que revelou a presença de catequina e ác. elárgico, porém diferentemente dos nossos resultados, identificaram os compostos epicatequina, ácido clorogênico e ácido gálico.

Molan et al. (2003), estudando folhas e raízes de extrato aquoso de *Cichoriumintybus*, sugerem que taninos presentes nos extratos apresentam atividade anti-helmíntica contra os parasitas: *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus*, *Trichostrongylus colubriformis*. Extratos metanólicos de *Achillea fragrantissima* apresentaram rica quantidade de flavonoides e taninos, o estudo relata bom desempenho do extrato contra o parasita *Trypanosoma evansi* em testes *in vivo* em ratos (IBRAHIM et. al. 2016).

Em nossos resultados, foi identificada a presença do ácido cafético no extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle*. Por ser um potente antioxidante fenólico, encontrado em altas concentrações em plantas, age inibindo a formação dos dímeros de timina no DNA das células da pele expostas à radiação UV, diminuindo o processo carcinogênico (LIN et. al. 2003). O ácido p-cumárico, também identificado no extrato, está diretamente envolvido na relação da estrutura da parede celular, estabelecendo formas de interação molecular que envolve ligações químicas com diversos carboidratos, não havendo relatos de efeito antiparasitário (JUNG; DEETZ, 1993).

Nossa hipótese é que o EMFRm apresenta propriedades esquistossomicida, a partir de seus metabólitos secundários por interferir na atividade motora e no acasalamento dos vermes. Para os vermes de shcistosoma, o acasalamento tem uma importância muito grande de sobrevivência, uma vez que os ovos são o produto da reprodução, e responsáveis pela patologia associada com a doença esquistossomose. Portanto, a investigação do acasalamento oferece oportunidades para interrupção do ciclo de vida dos vermes e na prevenção da patologia humana (ALVINE et al, 2016). Após 24h de incubação, na dose de 400 µg/mL, 75% dos vermes exibiram atividade motora reduzida com movimento unicamente nas extremidades (cabeça e/ou calda), ausência de movimentos peristálticos dos órgãos internos e das ventosas que não estavam aderidas e 100% estavam desacasalados.

Bandaranayake (1998) incentiva a pesquisa dos metabólitos secundários presentes nas plantas do mangue, devido ao potencial dos mesmos em produzir efeitos benéficos contra diversas doenças. Alemán et al (2011) verificaram a atividade larvicida em *Trichostrongylus* spp. de extrato metanólico de *R. mangle*, esses autores sugerem a ação aos taninos presentes na planta. A atividade anti-helmíntica de taninos condensados citados em ensaios *in vivo* se confirma geralmente por resultados de ensaios *in vitro* (HOSTE, 2006). Marrero et al (2006), mostraram que o extrato aquoso das cascas de *R. mangle* possui potencial anti-inflamatório *in vitro*, a partir da inibição das ciclooxygenase-2 e fosfolipase A2, enzimas participantes do processo inflamatório. Esses trabalhos apontam para os metabolitos secundários, tais como, taninos e flavonóides como sendo os responsáveis pelas ações relatadas em testes *in vivo* e *in vitro*.

Novas drogas com potencial esquistossomicida estão sendo pesquisadas e, muitas vezes, servem como modelos para possíveis alterações moleculares que resultam em maior eficácia. O PZQ é uma droga de primeira escolha no tratamento da esquistossomose, seu exato mecanismo de ação não é, ainda, totalmente compreendido, apesar de estudos extensivos. No entanto, sabe-se que provoca rápido influxo de cálcio, o que induz a contração espasmódica da musculatura dos vermes. Em seguida, o tegumento sofre grande destruição resultando na morte dos parasitas (AIRES et. al., 2013). No caso da exposição ao extrato de *R. mangle*, não foi evidenciado dano progressivo à membrana, logo, não parece estar diretamente relacionado com o influxo de cálcio, no entanto, o extrato demonstrou efetiva ação de desacasalamento já em 24h de exposição, que eventualmente leva a morte dos vermes fêmeas e inabilitiza o ciclo de vida do parasita. Cosgrove e Southgate (2002) observaram que machos solteiros de uma espécie de *Schistosoma* sequestram ativamente fêmeas emparelhadas de seus machos. Este fato é interessante para investigar os possíveis efeitos do fenômeno de desacasalamento na evolução de cepas resistentes aos medicamentos contra *Schistosoma*. O potencial esquistossomicida do extrato metanólico de folhas frescas de *R. mangle* parece estar associado ao fenômeno de desacasalamento, sugerindo assim, mais estudos a fim de averiguar o mecanismo de ação dos metabólitos secundários.

10 CONCLUSÕES

- O screening fitoquímico do extrato metanólico de folhas frescas de *Rhizophoramangle* revelou a presença de polifenóis, ácidos fenólicos e flavonóides apresentando um alto pico de retenção do flavonóide rutina.
- O extrato metanólico de folhas frescas de *Rhizophora mangle* nas concentrações de 400, 200 e $100\mu\text{g}/\text{ml}$ causou mortalidade dos vermes.
- O extrato metanólico de folhas frescas de *Rhizophora mangle*, em todas as concentrações foi capaz de causar alterações na motilidade e mesmo em concentrações mais baixas foi eficaz em causar desacasalamento.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-H, E.S. BAZAID, S.A.; SHOHAYEB, M.M.; EL-SAYED, M. M. AND EL-WAKIL, E. A. 2012. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. European Journal of Medicinal Plants, vol. 2, no. 2, pp. 93–112.
- AIRES A L, XIMENES EC, SILVA RA, BARBOSA VX, GÓES AJ, PEIXOTO CA, SOUZA VM, ALBUQUERQUE M. C. PAb. 2014. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms.** Exp Parasitol. 142:83-90.
- ALEMÁN Y. SÁNCHEZ L. M. PÉREZ T. RODRÍGUEZ Y. J.L. OLIVARES, RODRÍGUEZ J.G. 2011 Actividad larvicia de extractos de *rhizophora mangle* L. contra Estrongílidos Gastrointestinales de ovinos.** Rev. Salud Anim. Vol. 33 No. 2 111-115.
- ALVINE C. KENGNE-FOKAM, HUGUES C. NANA-DJEUNGA, FÉLICITÉ F. DJUIKWO-TEUKENG, FLOBERT NJIOKOU., 2016. Analysis of mating system, fecundity, hatching and survival rates in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria cameronensis*) in Cameroon** Kengne-Fokam et al. Parasites & Vectors 9:10.
- ALVINE C. KENGNE-FOKAM, HUGUES C. NANA-DJEUNGA, FÉLICITÉ F. DJUIKWO-TEUKENG, FLOBERT NJIOKOU., 2016. Analysis of mating system, fecundity, hatching and survival rates in two *Schistosoma mansoni* intermediate hosts (*Biomphalaria pfeifferi* and *Biomphalaria cameronensis*) in Cameroon** Kengne-Fokam et al. Parasites & Vectors 9:10.
- ANDRADE, Z. A. CUNHA, A. S. 1970. Imunopatologia. Esquistosomose mansoni.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 61-73.
- ANDREWS, T.J., CLOUGH, B.F. AND MULLER, G.J. 1984. Photosynthetic gas exchange properties and carbon isotope ratios of some mangroves in North Queensland.** In Physiology and management of mangroves (Teas, H.J. ed.) pp. 15-23 W Junk, The Hague.
- BALL, M.C. 1998. Mangrove species richness in relation to salinity and waterlogging: a case study along the Adelaide River floodplain, northern Australia.** Global Ecology and Biogeography Letters, 7 (1) : 73-82.
- BALL, M.C. AND PIDSLEY, S.M. 1995. Growth responses to salinity in relation to distribution of two mangrove species, *Sonneratia alba* and *S. lanceolata*, in northern Australia.** Functional Ecology, 9 (1): 77-85.
- BANDARANAYAKE, W.M., 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves.** Mangroves and Salt Marshes. 2 (3): 133–48.
- BEJTLICH C. L. 1996, Integrity Test For Porous Structures Using Acoustic Emission.** Millipore Investment holdings Limited.

BERENGUER, B. SANCHEZ, L.M., QUILEZ, A., LOPEZ-BARREIRO, M., HARO, O., GALVEZ, J., MARTIN, M.J., 2006. **Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers.** Journal of Ethnopharmacology 103: 194–200.

BERTÃO, H. G., SILVA, R. A. R., PADILHA, R. J. R., ALBUQUERQUE, M. C.P.A., RÁDIS-BAPTISTA, GANDHI., 2012. **Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms.** Parasitol.Res. 110, 2465–2473.

BHOSALE, L.J. 1995. **Propagation techniques for regeneration of mangrove forests-A new asset.** Journal of Non-timber Forest Products, 1 (3-4) : 119- 122.

BLACK, C. L. et al. 2009 **Impact of intense, longitudinal retreatment with praziquantel on cure rates of schistosomiasis mansoni in a cohort of occupationally exposed adults in western Kenya.** Trop. Med. Int. Health, v. 14, p. 450-457.

BOCKARIE, M. J. et al. 2013. **Preventive Chemotherapy as a Strategy for Elimination of Neglected Tropical Parasitic Diseases: Endgame Challenges.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v.368, n.1623,p. 1-11.

BOTROS, S. et al. 2005. **Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug.** J. Parasitol., v. 35, n. 7, p. 787-791.

BOURGAUD. F, GRAVOT. A, MILESI. S, GONTIER, E. 2001 **Plant Science Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** BUNT, J.S. AND BUNT, E.D. 1999. **Complexity and variety of zonal pattern in the mangroves of the Hinchinbrook area, Northeastern Australia.** Mangroves and Salt Marshes, 3 : 165-176.

CARNEIRO D. B, BARBOZA M. S. L, MENEZES M. P, 2010. **Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil.** Acta bot. bras. 24(4): 1027-1033.

CARVALHO, O. S. Et al. ***Shistosoma Mansoni* e esquistosomose uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. P: 739.

CHEN S.B., AI L., HU W., XU J., BERGQUIST R., QIN Z.Q., CHEN J.H., 2016. **New Anti-Schistosoma Approaches in The People's Republic of China: Development of Diagnostics, Vaccines and Other New Techniques Belonging to the 'Omics' Group.** Adv Parasitol 92, 385-408.

CHEN Y., HOU Y. , GUO Z. , WANG W. , ZHONG C. , ZHOU R., SHI1 S., 2015. **Applications of Multiple Nuclear Genes to the Molecular Phylogeny, Population Genetics and Hybrid Identification in the Mangrove Genus *Rhizophora*.** Published, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145058>.

CIMANGA, K. et al. 2002. **Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo.** Journal of Ethnopharmacology, v.79, n.2, p.213-20.

CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L. 2003 **Praziquantel**. Parasitology Research. 90(Supp 1):S3–S9. [PubMed:12811543].

CIOLI, D. et al. 1995 **Antischistosomal drugs: past, present ... and future?** Pharmacol.Ther. v. 68, n. 1, p. 35-85.

CLOUGH, B.F. 1984. **Growth and salt balance in the mangroves *Avicennia marina* (Forsk.)Vierh.and *Rhizophora stylosa* Griff. in relation to salinity.** Australian Journal of Plant Physiology, 11, 419-430.

CLOUGH, B.F. 1992. **Primary productivity and the growth of mangrove forests.** In “**Coastal and Estuarine Studies: Tropical mangrove ecosystems** (A.I. Robertson and D.M. Alongi, eds), pp. 225-250. American Geophysical Society, Washington DC., USA.

COELHO F, M. 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda. Journal of Ethnopharmacology, v. 126, p.159-175.

COELHO, M. V. **O parasito - Schistosoma mansoni.** In: CUNHA, A. S. (Ed.). **Esquistosomose mansoni.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1970. p. 1-10.

COSGROVE, C.L., SOUTHGATE, V.R., 2002. **Mating interactions between *Schistosoma mansoni* and *S. margebowiei*.** Parasitology 125, 233.

DE-FARIA, F. M., ALMEIDA, A.C.A., FERREIRA, A.L., DUNDERB, R. J., TAKAYAMAB, C., SILVA., M.S., SILVA, M. A., VILEGASC, W., ROZZAD, A. L., PELLIZZOND, C. H., TOMAE, W., SOUZA-BRITO, A.R.M., 2012. **Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L.** Journal of Ethnopharmacology. 139: 234– 243.

DOENHOFF, M. J. et al. 2002. **Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem?** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 96, n. 5, p. 465-469.

DOMROESE M, CHRISTINE E, MONIQUE S, AND LYNN G. 2010 **Treasures in the Sea:Our Bahamian Marine Resources.** Treasures in the Sea: American Museum of Natural History, 2007. Web. 17 Nov..<<http://treasures.amnh.org/>>.)

DONG, Y. X. et al. 2010. **Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 20, n. 8, p. 2481 2484.

ENGELHARDT H., 1979. **High Performurce Liquid Ckromutography, (Engl. ed.).** Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

ENGELS, D., DOENHOFF, M.J., 2002. **Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates.** Int. J. Parasitol. 34, 979–987.

FALLON, P. G. 1994 **Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine.** Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 51, n. 1, p. 83-88.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.(FAO). 2007. **The world's Mangroves 1980-2005**.FAO Forestry Paper.

FERNANDEZ, O., CAPDEVILA, J.Z., DALLA, G., MELCHOR, G., 2002. Efficacy of Rhizophora mangle aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. Fitoterapia. 73: 564-568.

GABA, S., JAMAL, S., DRUG DISCOVERY CONSORTIUM, O.S., SCARIA, V., 2014. **Cheminformatics models for inhibitors of Schistosoma mansoni thioredoxin glutathione reductase**. Scientific World J., v2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/957107>.

GRIMES JET, CROLL D, HARRISONWE, UTZINGER J, FREEMANMC, TEMPLETON MR. 2014, **The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis**. PLoS Negl Trop Di 8(12), e3296.

GRYSEELS, B. 2012. Schistosomiasis. Infectious Disease Clinics of North America, v. 26,n. 2, p. 383-397.

GUIDI, A. et al. 2010 **Praziquantel efficacy and long-term appraisal of schistosomiasis control in Pemba**. Trop. Med. Int. Health, v. 15, n. 5, p. 614-618.

HASLAM, E. 1996. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action**. Journal of Natural Products, v.59, p.205-15.

HOSTE H., JACKSON F., ATHANASIADOU S., THAMSBORG S.M., HOSKIN O., 2006. **The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants**. Trends Parasitol.; 22(6), 253-261.

IBRAHIM M. EL-ASHMAWY, NASER A. AL-WABEL, AIDA E. BAYAD., 2016. **Achillea fragrantissima, rich in flavonoids and tannins, potentiates the activity of diminazine aceturate against Trypanosoma evansi in rats**.Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 9(3), 228-234.

JUNG, H.G.; DEETZ,D.A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al.(Eds.) Forage cell wall structure and digestibility. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1993. p.315-346.

KASINATHAN, R. S. et al. 2010. **Schistosoma mansoni express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel**.Molecular and Biochemical Parasitology, v. 173, n. 1, p.2531.

KATZ, N. CARVALHO, O. S; 2008a.et al. **Terapêutica Clínica daEsquistosomose Mansoni.Schistosoma mansoni e esquistosomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro p. 850-856.

LACERDA, L. D. 2002. **Mangrove Ecosystems: Function and Management**. Berlin: Springer Verlag.

LAURENT, S. A. L. et al. 2008. **Synthesis of “Trioxaquartel”® derivatives as potential new antischistosomal drugs**. European Journal of Organic Chemistry,n. 5, p.895-913.

LIANG, Y. S. et al. 2001. **In vitro responses of praziquantel-resistant and – susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel.** Int. J. Parasitol., v. 31, n. 11, p.1227-1235.

LIANG, Y. S. et al. 2010. **Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of.** J. Helminthol., v. 84, n. 2, p. 202-207.

LIDIJA S, DRAGAN G, GORDANA V-N, 2000 **Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research.** Biochemical Engineering Journal 4 .89–99.

LIN J.Y, SELIM M.A, SHEA C.R, GRICHNIK J.M, OMAR M.M, MONTEIRO-RIVIERE N.A, PINNELL S.R. 2003. **UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E.** J Am Acad Dermatol.Jun;48(6):866-74.

MACHADO-SILVA, J. R. et al. CARVALHO, O. S. et al. 2008. **Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*.** In: CARVALHO, Omar dos Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech;

LENZI, Henrique Leonel (org.). ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Editora FioCruz, 2008. p. 4573.

MAIA, L. P.; LACERDA, L. D.; MONTEIRO, L. H. U.; SOUZA, G. M. 2005. **Estudo das Áreas de Manguezais do Nordeste do Brasil.** Fortaleza: UFC/ISME.

MARRERO, E., SÁNCHEZ, J., ARMAS, E., ESCOBAR, A., MELCHOR, G., ABAD, M. J., BERMEJO, P., VILLAR, A. M., MEGÍAS, J., ALCARAZ, M. J, 2006. **COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove).** Fitoterapia 77, 313–315.

MEDEIROS, R., OTUKI, M. F., AVELLAR, M. C. W., CALIXTO, J. B., 2007. **mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate.** European Journal of Pharmacology, 559(2-3): 227-235.

MELCHOR, G., ARMENTEROS, M., FERNANDEZ, O., LINARES, E., FRAGAS, I., 2001. **Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* Bark.** Fitoterapia. 72: 689-691.

MELMAN, S. D. et al. 2009. **Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*.** PLoS Negl. Trop. Dis., v. 3, n. 8,p. e504.

MOLAN AL, WAGHORN GC, MC NABB WC. 2003 **Effect of condensed tannins on egg hatching and larvaldevelopment of *Trichostrongylus colubriformis* invitro.** Vet Rec. 150:65-69.

NAGARAJAN Y, VENKATRAMAN A, MOHAMED Y S A, RADHAKRISHNAN M, ARUMUGAM C, MUNIYASAMY M P. 2015. **Chemical properties of essential oil from *Rhizophora mucronata* mangrove leaf against malarial mosquito *Anopheles stephensi* and filarial mosquito *Culex quinquefasciatus*.** Asian Pac J Trop Dis; 5(Suppl1): S67-S72.

NAGATO, L. A. F., DURAN, M. C., CARUSO, M. S. F., BARSOTTI, R. C. F., BADOLATO, E. S. G., 2001. **Monitoramento da Autenticidade de Amostras de Bebidas Alcoólicas Enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(1), 39-42.

NEWFOUND HARBOR MARINE INSTITUTE. 2016. **Reproductive Strategies of Mangroves.** Seacamp Association, Inc. Disponível em: <<http://www.nhmi.org/mangroves/rep.htm>>. Acesso em: 10. OUT. 2017

OLIVIER, L., STIREWALT, M. A., 1952. **An efficient meted for exposure of mice to cercarie of Schistosoma mansoni.** J. Parasitol 38, 19-23.

PERERA, L.M.S., ESCOBAR, A., SOUCCAR, C., REMIGIO, M.A., MANCEBO, B., 2010. **Pharmacological and toxicological evaluation of Rhizophora mangle L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract.** Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2 (4): 56-63.

PERTINO, M., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RODRIGUEZ, J. A., THEODULOZ, C., 2007. **Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (Jatropha isabelli).** Journal of Ethnopharmacology, 111(3): 553-559.

PRATA, A.R; COURAS, J.R., 2008. **Fase e formas clínicas da esquistossomose mansoni.** In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, , p.739-787.

QUACK, T. et al. 2010. **Cell cultures for schistosomes - Chances of success or wishful thinking?** J. Parasitol., v. 40, n. 9, p. 991-1002.

REY, L, 2008c. **Schistosoma mansoni e esquistossomíase: o parasita.** Parasitologia - parasitos e doenças parasitarias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 435-446.

REY, L. 2008b, **Schistosoma e esquistossomíase: epidemiologia e controle.** Parasitologia - parasitos e doenças parasitarias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.,v. 4. p. 475-499.

REYES, L.F., CISNEROS-ZEVALLOS, L. 2003. **Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (Solanum tuberosum L.).** J Agric Food Chem. 51 (18): 5296-300.

ROIG, J.T., 1974. **Plantas medicinales, aromaticas y venenosas de Cuba.** Editorial Revolucion y progreso, La Habana, p. 745.

ROLLINSON, D. et al. 2013 **Time to set the agenda for schistosomiasis elimination.** Acta Tropica, v. 128, n. 2, p. 423-440.

RONKETTI, F. et al. 2007. **Praziquantel derivatives I: modification of the aromatic ring.** Bioorg. Med. Chem. Lett., v. 17, n. 15, p. 4154-4157.

RUBY T, RANA C.S. 2015. **Plant secondary metabolites: a review** Department of Biotechnology, IMS Engineering College, Ghaziabad, U.P., India. International Journal of Engineering Research and General Science Volume 3, Issue 5, September-October, ISSN 2091-2730661.

SÁNCHEZ, J., MELCHOR, G., MARTÍNEZ, G., ESCOBAR, A., FAURE, R., 2006. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. Fitoterapia. 77: 141–143.

SANTOS, M. A. 2014, **Danos foliares em uma floresta de mangue na APA da barra do rio Mamanguape –PB.** 22 p.Trabalho de conclusão de curso -Universidade Federal da Paraíba.

SAYED, A. et al. 2008. **Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis.** Nature Medicine, v. 14, n. 4, p. 407-412.

SILVA, K. E. R. et al. 2012. **Alternativas terapêuticas no combate à EsquistososeMansônica.** Revista de Ciências farmacêuticas Basica e Aplicada, v. 33, n. 1, p. 9-16.

SIMEONOV, A. et al. 2008. **Quantitative high-throughput screen identifiesinhibitors of the Schistosoma.** PLoS Negl. Trop. Dis., v. 2, n. 1, p. e127.

SMITHER S. R., TERRY R. J., 1965. **Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*).** Parasitol 55, 701-710.

TARIWARI C.N. ANGAYE, E I. OHIMAIN, E P. SIASIA, P I. ASAIGBE AND OLADUNI A. FINOMO. 2014. Paper Larvicidal activities of the leaves of Niger Delta mangrove plants against *Anopheles gambiae*. Journal of Microbiology Research Vol. 2(7).

THE SCHOOL OF FOREST RESOURCES AND CONSERVATION. **Plants of Florida's Mangrove Forests.** University of Florida. Web. 01 Jan. 2011.) <<http://www.sfrc.ufl.edu>>.

VAN HELLEMOND, J. J. et al. 2006 **Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome.** International Journal for Parasitology, v.36,n.6, p.691-69.

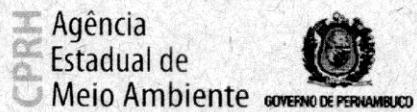
WENDEL, G. H., TEVES, M.R., PAREDES, J. D., SANCHEZ PERERA, L.M., PELZER, L. E., 2013. Evaluation of the Antidiarrheal Activity of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). Latin American Journal of Pharmacy. 32 (1): 128-31.

WHO, 2016. World Health Organization, WHO.

WILLIAM, L.A.D., 1999. ***Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) Triterpenoids with Insecticidal Activity.** Naturwissenschaften, 86, 450–452.

WOELFLE, M. et al. 2011. **Resolution of Praziquantel.** PLoS Negl. Trop. Dis., v. 5, n. 9, p.e1260.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL VEGETAL



CA DRFB N° 120/2014

24 de outubro de 2014.

Ao Senhor

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

Prezado Senhor,

Cumprimentando Vossa Senhoria, nos reportamos ao Processo CPRH n° 013520/2014, referente ao requerimento para realização de atividades de pesquisa na APA de Santa Cruz e na APA Estuarina de Santa Cruz, sendo o local de coleta às margens do Canal de Santa Cruz e Rio Paripe, próximo a Vila Velha, Ilha de Itamaracá - PE.

Após análise da documentação apresentada vimos informar que o projeto **"Tecnologia Morfológica Aplicada à Inovação Terapêutica: - Uma Perspectiva de Investigação de Produtos Naturais da Região de Mangue"** foi aprovado, estando autorizada a realização da citada pesquisa. No entanto, em caso de realização de atividades em áreas particulares, estas somente poderão ocorrer mediante a anuência do proprietário das terras. Salientamos ainda, que esta autorização permite as atividades de campo e coleta de material para estudo, entretanto, o acesso ao patrimônio genético deverá ser autorizado pelos órgãos competentes.

Informamos que a Unidade de Conservação APA de Santa Cruz possui sede e administração local, desta forma, caso haja necessidade de apoio para a realização das atividades de campo, faz-se necessário contato prévio com a equipe de gestão da Unidade.

Atenciosamente,

Cinthia Renata Vieira de Lima
CINTHIA RENATA VIEIRA DE LIMA

Diretoria de Recursos Florestais e Biodiversidade

ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
51670-420 / Recife - PE - Brasil
phones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8361
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 01 de julho de 2016.

Ofício nº 62/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Departamento de Histologia e Embriologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0006/2016

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial esquistossomicida de *Rhizophora mangle*", registrada com o nº 0006/2016, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 6 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/06/2016.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 30/11/2018 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo Swiss Webster |
| Nº de animais | 10 |
| Pesoidade | 30g(±2g)/ 30 dias |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) |

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Parecer CEUA / CCI-UFPE
SIAPE 21805584