UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de
alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil”**

Mariza Abreu Miranda

**Ribeirão Preto
2010**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de
alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Mariza Abreu Miranda

Orientador: Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Miranda, Mariza Abreu

Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. Ribeirão Preto, 2010.

110p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Solanum lycocarpum*. 2. solamargina. 3. solasonina. 4. solasodina. 5. leishmaniose. 6. estrongiloidíase. 7. esquistossomose.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Mariza Abreu Miranda

Título do trabalho: Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente, aos meus pais Fátima e João e a meus queridos irmãos, Luciana e Wilson, por sempre me apoiarem e auxiliarem em todas as etapas de minha vida.

Aos meus queridos(as) amigos(as), que perto ou distante sempre torceram pela minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos da realização deste trabalho, me protegendo e guiando para que fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela orientação e oportunidade.

Aos professores do laboratório de farmacognosia, Dr. Fernando Batista da Costa e Dr^a Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado, por sempre auxiliarem meu crescimento.

A família de amigos do laboratório de Farmacognosia: Cris, Dani, Eli, Gobbo, João Paulo, July (filhinha), Juzinha, Mauro, Ricardo, Rejane, Wanessa e Willian por toda troca de conhecimento e companheirismo e, de uma forma especial, a amiga Renata que muito me ensinou e contribuiu, incondicionalmente, para que este trabalho fosse realizado, caminhando sempre lado a lado.

Aos técnicos do nosso laboratório, Valtinho e Mário.

Ao Reinaldo e Ramon, do biotério, pela paciência e auxílio com meus animais.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, pela identificação botânica da espécie trabalhada.

Ao Prof. Dr. Noberto Pepporine Lopes e Tomás pelos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Sergio Albuquerque, pelo acompanhamento dos ensaios leishmanicidas. Aos técnicos e novos amigos que surgiram no decorrer da caminhada do laboratório de Parasitologia: Mariana"s", Kelly, Christian e Gustavo.

A Prof. Dr^a. Silmara Marques Allegrete e a aluna de mestrado Letícia Aparecida Duarte Bastos pelos ensaios contra *Strongyloides*.

A Dr^a Lizandra Guidi Magalhães, ao Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues e às técnicas Mara e Elenice do laboratório de Biologia Celular e Molecular de Parasitas, por todo ensinamento e auxílio na realização dos ensaios contra *S. mansoni*.

Ao Prof. Sérgio Zucolloto e aluno de mestrado João Felipe Rito Cardoso pelo auxílio nas histologias do fígado.

À Prof. Dr^a Mônica Tallarico Pupo pelo uso de equipamentos do laboratório de Química Farmacêutica e a Dr^a Adriana Aparecida Lopes, do mesmo laboratório, pelo auxílio na elucidação estrutural dos compostos isolados juntamente com Eliane.

Às amigas irmãs: Fabrícia e Juliana (July) pela família que somos em Ribeirão.

Aos amigos, de perto ou longe, que sempre torceram e ajudaram na realização deste trabalho: Fernanda, Simoninha, Rodrigo “Molila” (por todo ensinamento de elucidação), Lorena, Diogo, Milena, Noemi, Dayana e Silvinha, e, de uma forma especial ao amigo Janderson (Jand) por sempre me escutar, apoiar e motivar a realização deste trabalho.

A todos meus familiares, especialmente minhas tias Laurinda, Penha e meu tio Sebatião por todas as orações e apoio.

À Coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local de desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e apoio financeiro.

"Todos vivemos sobre o mesmo céu, mas ninguém tem o mesmo horizonte."

(Konrad Adenauer)

RESUMO

MIRANDA, M. A. **Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.** 2010. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Solanum lycocarpum A. St.- Hil. (Solanaceae) é uma espécie nativa do Brasil distribuída nas regiões sudeste e centro-oeste do país. O fruto desta planta é popularmente conhecido por “fruta do lobo”. O consumo destes frutos impede o desenvolvimento de uma parasitose renal (*Dioctophyna renale*) que afeta lobos (*Chrysocyon brachyurus*). Estes frutos contêm dois principais heterosídeos alcaloídicos: solamargina (SM) e solasonina (SS), sendo ambos derivados da aglicona solasodina (SD). Doenças parasitárias, como leishmaniose, esquistossomose e strongiloidíase estão diretamente ligadas a questões socioeconômicas representando um grande problema de saúde pública principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Portanto, é extremamente importante a busca de novos fármacos para estas e outras doenças negligenciadas. O presente trabalho descreve a obtenção do extrato alcaloídico (EA) a partir dos frutos da lobeira, o isolamento dos heterosídeos alcaloídicos majoritários e da aglicona SD, bem como a avaliação de suas atividades *in vitro* leishmanicida, strongilicida e esquistossomicida. Além disso, a atividade esquistossomicida do EA também foi avaliada em modelo animal. O EA foi obtido a partir de frutos secos e triturado por meio de extração ácido-base. SM e SS foram isolados por cromatografia em camada delgada preparativa ou por cromatografia flash. SD foi obtida a partir da hidrólise ácida do EA, e purificada por cromatografia em coluna clássica utilizando eluição por gradiente. As estruturas dos compostos isolados foram confirmadas por análises de RMN e espectrometria de massas. Nas avaliações biológicas observaram-se atividade leishmanicida, strongilicida e esquistossomicida do EA. Os compostos isolados, SM, SS e a mistura equimolar foram ativos contra *L. amazonensis*. Além disso, esses compostos foram capazes de reduzir a atividade motora de vermes adultos de *S. mansoni*, separar os pares de verme adulto em macho e fêmea, causar a morte dos vermes, alterar o tegumento e reduzir o desenvolvimento dos ovos *in vitro*. A SD foi inativa contra *L. amazonensis* e vermes adultos de *S. mansoni*. O EA avaliado *in vivo* mostrou atividade esquistossomicida, diminuindo o número de ovos e granulomas no fígado dos animais tratados.

Palavras-chave: *Solanum lycocarpum*, solamargina, solasonina, solasodina, leishmaniose, strongiloidíase, esquistossomose.

ABSTRACT

MIRANDA, M. A. **Evaluation of the antiparasitic potential of the alkaloidic extract and of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil fruits.** 2010. 110f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The Brazilian Solanaceae plant, *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. is distributed in the Southeast and Middle West of the country. The fruit of this plant is popularly known as “fruta do lobo” (wolf-fruit). The intake of these fruits prevents renal parasitism (*Dioctophyna renale*) which affects wolves (*Chrysocyon brachyurus*). These fruits contain two major alkaloid heterosides (solamargine (SM) and solasonine (SS)) bearing both the same aglycone, solasodine (SD). Among the parasitic diseases, such as leishmaniasis, strongyloidiasis and schistosomiasis stand out in terms of socioeconomic and public health importance in tropical and subtropical areas. It's extremely important to search for new drugs to treat these and other neglected diseases. The present work reports the obtainment of the alkaloidic extract (AE) of the *S. lycocarpum* fruit, the isolation of the major alkaloid heterosides and to obtain the aglycone. The obtained samples were evaluated for the *in vitro* leishmanicidal, strongyloicidal and schistosomicidal activities. Also, the schistosomicidal activity of the AE was evaluated in an animal model. The AE was obtained from dried and grounded fruits by using acid-base extraction. SM and SS were isolated either by preparative thin layer chromatography or by flash chromatography. SD was obtained by acid hydrolyses of the AE, and it was purified by silica gel column chromatography using gradient elution. The structures of the isolated compounds were confirmed by analysis of NMR and mass spectrometry. The analysis of the obtained results for the biological evaluation showed that the AE displays leishmanicidal, strongyloicidal and schistosomicidal activities. The isolated compounds, SM, SS and their equimolar mix were actived against *L. amazonensis*. These compounds also were able to reduce the mobility, to separate the worm into male and female, to modify the tegumental and to cause the death of the adults worms besides reducing the development of eggs. The SD was inactive against *L. amazonensis* and *S. mansoni* adult worms. When AE was evaluated *in vivo* showed activity as schistosomicidal, decreasing the number of eggs and granulomas in the liver of the treated mice.

Keywords: *Solanum lycocarpum*, solamargine, solasonine, solasodine, leishmaniasis, strongyloidiasis, schistosomiasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da solanina	2
Figura 2: Estrutura da tomatidina.....	2
Figura 3: Aspectos morfológicos do fruto e da árvore de <i>Solanum lycocarpum</i>	3
Figura 4: Estrutura química da solasonina	6
Figura 5: Estrutura química da solamargina.....	6
Figura 6: Estrutura química da solasodina	7
Figura 7: Ciclo biológico da leishmaniose	11
Figura 8: Ciclo biológico do <i>Strongyloides</i>	12
Figura 9: Ciclo biológico da esquistosomose	14
Figura 10: Granuloma causado pela deposição de ovos no fígado.....	15
Figura 11: Perfis na CCDC das frações alcalóidicas.....	34
Figura 12: Cromatograma do extrato alcalóidico por CLAE	35
Figura 13: Perfil cromatográfico dos compostos isolados por CLAE preparativo.....	37
Figura 14: Eluição do extrato alcalóidico em CCDP	38
Figura 15: Análise da solasodina em CLAE-DAD	39
Figura 16: Fragmentação da molécula de solasonina por ESI	40
Figura 17: Desidratação da molécula de solasodina.....	40
Figura 18: Núcleo esteroidal e correlações observadas HMBC e COSY.	44
Figura 19: Curva dose-resposta para a atividade citotóxica.....	45
Figura 20: Curva dose-resposta para a atividade leishmanicida.....	47
Figura 21: Porcentagem de letalidade sobre <i>Strongyloides</i>	49
Figura 22: Alterações no tegumento dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	51
Figura 23: Estágios de desenvolvimento dos ovos	54
Figura 24: Análise quantitativa do desenvolvimento dos ovos.	55
Figura 25: Ilustração do desenvolvimento dos ovos.....	55
Figura 26: Carga parasitária total após tratamento	58
Figura 27: Número de ovos presente nos fígados dos animais.....	60
Figura 28: Média do número de granulomas/ fígado.....	61
Figura 29: Média da área dos granulomas dos grupos tratados e controle.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frações obtidas para o isolamento da solasodina.....	24
Tabela 2: Análise quantitativa da droga vegetal e do extrato alcaloídico	35
Tabela 3: Relação dos compostos e seus respectivos erros relativos	41
Tabela 4: Dados de RMN ¹ H (500 MHz; CD ₃ OD, δ 1H (multiplicidade) e HMQC	42
Tabela 5: Valores de CI ₅₀ em 24 e 72 h do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre células LLCMK ₂	46
Tabela 6: Valores de CI ₅₀ em 24 e 72 h do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre a forma promastigota de <i>L. amazonensis</i>	47
Tabela 7: Motilidade dos vermes em diferentes concentrações do extrato	49
Tabela 8: Efeito <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	51
Tabela 9: Média ± desvio padrão dos vermes recuperados na perfusão.....	57
Tabela 10: Pesos médios ± desvio padrão dos fígados e baços dos animais	59
Tabela 11: Porcentagem de redução de ovos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
CH ₃ COOH	ácido acético
ACN	acetonitrila
BuOH	butanol
CCDC	cromatografia em capa delgada comparativa
CCDP	cromatografia em capa delgada preparativa
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	gás carbônico
DAD	arranjo diodo
DMSO	dimetil sulfóxido
DP	desvio padrão
EA	extrato alcaloídico
EM	espectrometria de massas
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido 1-piperaziletanosulfônico
LTA	leishmaniose tegumentar americana
M	molar
MeOH	metanol
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
R _f	Fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	solasodina
SM	solamargina
SS	solasonina

SS+SM	mistura equimolar de solasonina com solamargina
TFA	trifluoracetico
THF	tetraidrofurano
Tr	tempo de retenção
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
1. Introdução	1
1.1 Plantas medicinais.....	1
1.2 Família Solanaceae e o gênero <i>Solanum</i>	1
1.3 A espécie <i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hil e aspectos farmacológicos	2
1.4 <i>Chrysocyon brachyurus</i> ("lobo-guará")	5
1.5 Atividades dos heterosídeos alcalóidicos solamargina e solasonina e da aglicona solasodina	5
1.6 O bioma Cerrado	8
1.7 Doenças parasitárias.....	9
1.7.1 Leishmaniose	9
1.7.2 Estrongiloidíase	12
1.7.3 Esquistossomose	13
2. JUSTIFICATIVA	17
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo geral:	18
3.2 Objetivos específicos:.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Coleta dos frutos de <i>S. lycocarpum</i>	19
4.2 Preparo do extrato alcalóidico.....	19
4.3 Caracterização físico-química dos frutos desidratados	20
4.3.1 Determinação do teor de umidade	20
4.3.2 Determinação das cinzas totais.....	20
4.4 Isolamento e análise dos heterosídeos alcalóidicos.....	20
4.4.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	20
4.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	20
4.4.3 Otimização de fase móvel para cromatografia em camada delgada (CCDC) ..	21

4.4.4 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	21
4.4.5 Cromatografia <i>flash</i> do extrato alcaloídico	22
4.4.6 Cromatografia preparativa em CLAE.....	22
4.4.7 Cromatografia de camada delgada preparativa	23
4.4.8 Isolamento da aglicona solasodina.....	23
4.4.9 Análise por espectrometria de massas dos compostos isolados	24
4.4.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) dos compostos isolados	24
4.5 Ensaios biológicos.....	25
4.5.1. Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico e dos compostos isolados em células LLCMK ₂	25
4.5.2. Avaliação da atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	26
4.5.3 Análise dos dados	27
4.5.4 Atividade <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico sobre <i>Strongyloides venezuelensis</i>	27
4.5.5 Ensaio Esquistossomicida.....	28
4.5.5.1 Manutenção do ciclo de <i>S. mansoni</i>	28
4.5.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do extrato alcaloídico e compostos isolados em vermes adultos e no desenvolvimento de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	29
4.5.5.3 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vivo</i> do extrato alcaloídico.....	30
4.5.5.4 Análises histológicas	31
4.5.5.5 Análise estatística para os ensaios esquistossomicidas	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 Obtenção do extrato alcaloídico	33
5.2 Avaliação do teor de umidade e cinzas totais	33
5.3 Desenvolvimento de fase móvel para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	34
5.4 Desenvolvimento de método analítico por CLAE	34
5.5 Isolamento.....	36
5.5.1 Cromatografia <i>flash</i> do extrato alcaloídico	36
5.5.2 Cromatografia preparativa em CLAE.....	36
5.5.3 Cromatografia de camada delgada preparativa	37
5.5.4 Isolamento da aglicona solasodina.....	38
5.6 Análise dos compostos isolados por espectrometria de massas	39

5.7 Análise dos compostos isolados por ressonância magnética nuclear.....	41
5.8 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico e dos compostos isolados sobre células LLCMK ₂	45
5.9 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	46
5.10 Atividade <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico sobre <i>Strongyloides venezuelensis</i>	48
5.11 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do extrato alcaloídico e compostos isolados em vermes adultos e no desenvolvimento de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	50
5.12 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vivo</i> do extrato alcaloídico.....	55
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	65
APÊNCICES.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

O contínuo aparecimento de diferentes patógenos resistentes aos fármacos, os elevados custos dos medicamentos e seus frequentes efeitos adversos no organismo humano têm desencadeado pesquisas por novos agentes terapêuticos. Dentro dessas pesquisas, os princípios ativos presentes nas plantas medicinais têm se destacado (CALIXTO, 2000; FERRO, 2006; NAKAMURA et al., 2006; SIMÕES et al., 2007).

Seguindo esse pressuposto e baseando-se no fato de que a cultura dos povos apresenta várias e relevantes informações etnofarmacológicas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou, a partir da década de 70, a incentivar o uso da fitoterapia pautada em critérios de qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2000; LORENZI, MATOS, 2002).

Neste contexto, investigações etnodirigidas (etnofarmacologia e etnobotânica) e a observação de interações plantas-animais (zoofarmacognosia) têm sido as principais estratégias para a seleção de plantas medicinais a serem estudadas. Tal caminho demanda menor tempo e baixo custo na coleta de informações podendo constituir um valioso atalho para a descoberta de fármacos (ELISABETSKY, 2003; ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006).

1.2 Família Solanaceae e o gênero *Solanum*

A família Solanaceae possui distribuição cosmopolita, estando concentrada na região tropical. No Brasil ocorrem 32 gêneros e 350 espécies. Diversas plantas de interesse econômico pertencem a esta família como o tomate (*Solanum lycopersicum*), a batata (*Solanum tuberosum*), o fumo (*Nicotiana tabacum*), o pimentão (*Capsicum ssp*) e a berinjela (*Solanum melongena*) (SOUZA, LORENZI, 2005).

Espécies dessa família acumulam alcalóides esteroidais, como por exemplo, a solanina (Figura 1) e a tomatidina (Figura 2) (SOUZA et al., 2002).

Figura 1: Estrutura da solanina

Figura 2: Estrutura da tomatidina

O gênero *Solanum* é conhecido pela presença de altas concentrações de alcalóides. Solasonina e solamargina são dois heterosídeos alcaloídicos (comumente denominados glicoalcalóides) encontrados em pelo menos 100 espécies de *Solanum* (BLANKEMEYER et al., 1998).

Heterosídeos alcaloídicos são metabólitos secundários que têm finalidade de proteger a planta da agressão de fitopatógenos e de predadores. Em alguns casos podem ser tóxicos para o homem e outros mamíferos (HARAGUCHI et al., 1978; JADHAV, SHARMA, SALUNKHE, 1981; FRIEDMAN, MCDONALD, 1997; CHAM, 2007).

1.3 A espécie *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil e aspectos farmacológicos

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (do grego “lycos” = lobo e “karpos” = fruto) (Figura 3) pertence à família Solanaceae, sendo popularmente conhecida como “lobeira”, “fruta-do-lobo”, “jurubebão”, “baba-de-boi”, “berinjela-do-campo” e “maçã-do-cerrado” (CRUZ, 1985; ALMEIDA et al., 1994; SILVA et al., 1994). É uma espécie nativa do Brasil, distribuída principalmente pelo cerrado e região central do Brasil (LORENZI, 1992).

Figura 3: Aspectos morfológicos do fruto e da árvore de *Solanum lycocarpum*

Fonte: TATAGIBA, 2009.

A espécie é um arbusto de 2 a 4 metros de altura, que possui muitos ramos, sendo revestidos de pêlos densos estrelados, ramos cilíndricos, lenhosos e fistulosos de folhas simples e alternas (CRUZ, 1985; PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, MATOS, 2002).

S. lycocarpum cresce e se desenvolve em condições ambientais desfavoráveis como em terras ácidas e pobres em nutrientes. É capaz de suportar um clima árido e períodos de seca prolongada, resistindo a ciclos anuais de queimadas feitas pelo homem (CAMPOS, 1994; BRIANI, GUIMARÃES JUNIOR, 2007).

As folhas são utilizadas para o tratamento de epilepsia, espasmos, dor abdominal e renal (CRUZ, 1985).

A infusão da raiz da lobeira é usada contra hepatite (ALMEIDA et al, 1994; LORENZI, 1992).

Os frutos são grandes, esféricos, de coloração verde, atingindo 8 -12 cm de diâmetro. As plantas podem apresentar de 40 a 100 frutos, cuja massa pode variar de 400 a 900 gramas cada (SILVA et al., 1994). São comestíveis e reputados como medicinais, sendo utilizados como anti-inflamatório, hipocolesterolêmico, hipoglicemiante, sedativo, diurético, antiespasmódico, antiepilético e para o controle da obesidade (LORENZI, 1992; DALL' AGNOL, VON POSER, 2000).

O suco dos frutos, aplicado externamente, é utilizado para eliminação de verrugas e para picadas de cobra. Quando aplicado sobre partes atrofiadas, o fruto assado e quente faz com que o tecido se regenere. Já o xarope, com ele produzido, é utilizado contra asma (PIO CORREA, 1984; LORENZI, 1992; ALMEIDA et al, 1994; LORENZI, MATOS, 2002).

Os frutos possuem grande importância ecológica, pois constituem fonte alimentar para diversas espécies de mamíferos durante todo o ano, especialmente durante a estação de seca. Destaca-se uma espécie de lobo (*Chrysocyon brachyurus*) popularmente conhecido por “lobo-guará”. Esse animal é encontrado no Cerrado e alimenta-se principalmente dos frutos de *S. lycocarpum* (DIETZ, 1984; POTTI, POTT, 1994; MOTA JÚNIOR, MARTINS, 2002).

Foram isolados dos frutos de *S. lycocarpum* dois heterosídeos alcalóidicos majoritários: solamargina e solasonina (MOTIDOME et al., 1970; ALMEIDA et al., 1994). Um estudo fitoquímico, dos frutos verdes, revelou a presença de 1,85 % de alcalóides totais (SCHWARZ et al., 2007).

O “polvilho-da-lobeira”, produzido a partir da polpa dos frutos de *S. lycocarpum*, pode ser obtido comercialmente em cápsulas, sendo utilizado como hipoglicemiante não apenas pela população do Cerrado brasileiro, mas em todo o país (DALL’AGNOL, VON POSER, 2000).

Outros estudos demonstram que extratos metanólicos dos frutos da “lobeira” inibiram o aumento no nível de glicose sérica em ratos diabéticos. A partir de frações ativas de tal extrato conseguiram-se isolar alcalóides esteroidais majoritários e outros constituintes como 12-hidroxisolasonina, robenosídeos A e B (YOSHIKAWA et al., 2007).

A atividade hipoglicemiante e inibição na atividade de esvaziamento gástrico também são descritas em outros estudos realizados com os frutos (VALLE, 1978; DALL’AGNOL, VON POSER, 2000).

Segundo Dall’Agnol e Von Poser (2000), ao analisarem um fitomedicamento composto de pó dos frutos da “lobeira” e analisarem os frutos separadamente, verificaram que o único grupo de compostos que ocorreram simultaneamente na formulação e nos frutos foram os polissacarídeos, incluindo pectina, mucilagem e amido. Eles foram encontrados como principal elemento e poderiam estar atuando para as atividades hipoglicemiante e hipocolesterolemiantes do “polvilho-de-lobeira”.

Oliveira Junior et al. (2003) analisaram alguns nutrientes do fruto durante o amadurecimento, observando que os teores de açúcares solúveis totais, açúcares não-redutores e vitamina C, aumentaram gradativamente com a diminuição dos teores de amido. Os teores encontrados na “lobeira” de vitamina C (85 mg), açúcares solúveis totais (11 g), sacarose (8,6 g), fósforo (35,5 mg) e ferro (1,2 mg) em 100 g de polpa fresca, comparados aos de outros frutos, como abacaxi, banana,

laranja, manga, entre outros, são equivalentes ou superiores aos dos frutos em questão, concluindo-se que o fruto da “lobeira” representa mais uma alternativa como fonte daqueles nutrientes.

Cinco saponinas esteroidais, liconosídeos Ia, Ib, II, III, IV e um pseudoalcalóide esteroidal oligoglicosídico chamado lobo-frutosídeo também foram isolados de frutos de *S. lycocarpum* (YOSHIKAWA et al., 2007; NAKAMURA et al., 2008).

1.4 *Chrysocyon brachyurus* (“lobo-guará”)

O “lobo-guará” (*Chrysocyon brachyurus*) pertence à classe Mammalia, ordem Carnívora, família Canidae e gênero *Chrysocyon*. É o maior cánido da América do Sul, estando presente principalmente nos ecossistemas do cerrado e campo. No Brasil, é considerada uma espécie ameaçada de extinção. Possui mandíbulas fracas e se alimenta de vegetais, frutas silvestres e pequenos animais. Em sua dieta é indispensável o fruto da “lobeira” que atua como um vermífugo natural contra uma parasitose renal, denominada popularmente por “verme-gigante-dos-rins”, provocada pelo nematóide *Diectophyna renale* que ocorre com alta frequência e pode ser fatal no lobo. É reconhecidamente, um importante dispersor de sementes da espécie *S. lycocarpum* (LOMBARDI, MOTTA JUNIOR, 1993; SILVA, 2002).

Trabalhos realizados analisando amostras fecais coletadas do “lobo-guará” identificaram o fruto da “lobeira” como o item mais encontrado na dieta do lobo (BELENTANI, 2001; OLIVEIRA, CIOCHETI, PIVELLO, 2007).

1.5 Atividades dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina e da aglicona solasodina

Solasonina (Figura 4) e solamargina (Figura 5) são dois dos principais heterosídeos alcaloídicos extraídos de *S. lycocarpum*. São compostos com um núcleo central esteroidal e com carboidratos do tipo trissacarídeos. A única diferença que ocorre entre eles é que na α -solamargina duas unidades de ramnose estão nas posições 2' e 4' do carbono ligado à D-glicose, enquanto a α -solasonina tem uma ramnose e uma glicose nas posições 2' e 3' da D-galactose, respectivamente (RIPPERGER, 1995; ELTAYEB, 1998).

Figura 4: Estrutura química da solasonina

Figura 5: Estrutura química da solamargina

A aglicona da solamargina e da solasonina, a solasodina (Figura 6), pode ser utilizada para a fabricação de medicamentos esteroidais, como os contraceptivos e anti-inflamatórios. Solasodina pode, por exemplo, fornecer o acetato de 16-deidropregnenolona a partir do qual forma-se o acetato de deidroepiandrosterona que é uma das principais fontes para produção de andrógeno (GOSWANI et al., 2003).

Figura 6: Estrutura química da solasodina

Pesquisas revelam que alcalóides com configuração estereoespecífica para a síntese de hormônios esteroidais encontrados em *S. lycocarpum* e em outras espécies do gênero *Solanum* podem agir como fitoestrógenos causando toxicidade em embriões e revelam também que um efeito em longo prazo pode causar anormalidades no desenvolvimento do sistema reprodutor do feto e variar o funcionamento do sistema endócrino das monoaminas. Por isso, a utilização de espécies ricas em tais constituintes, durante a gravidez, deve ser realizada com extrema cautela (RODDICK, 1989; CHANG et al., 2002; MARUO, BERNARDI, SPINOSA, 2003; SCHWARZ et al., 2005).

A mistura de solasonina e solamargina demonstrou sinergismo na citotoxicidade em células tumorais. Efeitos similares foram descritos em alguns protistas e em estudos de avaliação antifúngica (CHAM, DAUNTER, 1990; FEWELL, RODDICK, WEISSENBERG, 1994; CHAM, 2007).

A importância dos açúcares ligados, nos efeitos da solasonina e solamargina, tem sido repetidamente confirmada. Estudos do efeito citolítico dos heterosídeos alcaloídicos em Hep3B e em linhagens de células tumorais de sarcoma 180 demonstraram interação entre proteínas ligadoras de ramnose-específica (PLRs) no alvo da superfície de células com a ramnose terminal dos alcalóides (CHAM, DANTER, 1990). A importância da ramnose na toxicidade contra nematóides fitoparasitas, também tem sido confirmada (UDALOVA et al., 2004).

Os heterosídeos alcaloídicos solasonina e solamargina, extraídos de uma espécie do gênero *Solanum* foram ativos contra as formas epimastigotas e

tripomastigotas de duas diferentes cepas de *T. cruzi*, demonstrando que a solasonina requer maior concentração para induzir resultado similar ao da solamargina. Nesse caso a eficácia da solamargina, com suas duas ramnosos terminais, foi maior mesmo quando se comparou o efeito dos dois glicosídeos testados na proporção de 1:1 (CHATAING et al., 1998; HALL, HOBBY, CIPOLLINI, 2006). Tal fato pode ser subjetivamente explicado pela posição do açúcar terminal na solamargina, sendo mais favorável para se ligar à superfície celular do parasita (FERGUSON, 1997).

1.6 O bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando uma extensão de aproximadamente 1,8 milhões de km². É a maior savana do mundo, o segundo maior bioma da América Latina e ocupava uma área que corresponde a 23% do território nacional. Limita-se com quase todos os outros biomas. O Cerrado destaca-se pela grande diversidade de espécies de animais e plantas (SILVA, BATES, 2002; AGUIAR et al. 2004).

Uma característica marcante deste bioma em termos de biodiversidade é o nível de endemismo. De acordo com Myers et al. (2000), cerca de 44 % das espécies vasculares são endêmicas.

Nos últimos 40 anos, o Cerrado vem sendo explorado de forma rápida e extensiva (LIMA, SILVA, 2005), principalmente para formação de pastos, lavouras e carvoarias. Atualmente, a região por ele ocupada representa a principal produtora de grãos e de gado de corte do país, o que resultou em grande devastação da vegetação nas últimas décadas. Estima-se uma perda média anual de 9,75 milhões de hectares. Cerca de 57 % da vegetação original já foram completamente destruídas e a metade das áreas remanescentes está bastante alterada (MYERS et al., 2000; AGUIAR et al. 2004).

Em decorrência do endemismo e da atual velocidade de devastação, o Cerrado é considerado, desde o ano de 2000, uma das 25 áreas críticas para a conservação mundial. Tais áreas críticas com endemismo e elevado grau de ameaça de perda de biodiversidade são denominadas “hot spots” para a conservação do planeta (MYERS et al., 2000).

O percentual de Cerrado que se encontra protegido em Unidades de Conservação representa pouco mais de 3% de sua área original (AGUIAR et al., 2004). Cerca de 20% das espécies ameaçadas deste bioma não são protegidas pelas Unidades de Conservação (ALHO, 2005).

A conservação da diversidade genética é uma condição necessária à manutenção de todos os outros níveis da biodiversidade, e é um componente essencial da sustentabilidade das populações (AGUIAR et al., 2004).

1.7 Doenças parasitárias

1.7.1 Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. São representados por parasitas obrigatórios (REITHINGER et al., 2007).

Embora parasitas patogênicos, incluídos nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, possuam uma organização genômica e uma estrutura celular e morfológica similar durante seu ciclo de vida, esses protozoários flagelados causam distintas patologias humanas e são transmitidos por diferentes insetos vetores (STUART et al., 2008).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por diferentes espécies de *Leishmania* entre elas *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O ciclo biológico destes protozoários é heteroxeno (realizado em dois hospedeiros): um vertebrado (mamífero) e um invertebrado (inseto: flebotomíneo). É uma doença endêmica em áreas tropicais, subtropicais e no Mediterrâneo. A OMS estima que no mundo haja aproximadamente, 14 milhões de pessoas infectadas havendo mais de 19 mil casos de leishmaniose tegumentar reportados no Brasil em 2008 (NEVES et al., 2005; OMS, 2008).

A *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos, com duas formas principais: uma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestivo de inseto vetor, e outra

sem flagelo (amastigota), observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (NEVES et al., 2005).

Insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Gênero *Lutzomya* são responsáveis pela transmissão da LTA. Esses vetores apresentam nomes populares dependendo da região geográfica brasileira, como por exemplo, mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Muitos animais são considerados reservatórios (canídeos, felídeos e equídeos, entre outros) e garantem a circulação das leishmanias na natureza e entre o homem (NEVES et al., 2005; BATES, 2007).

O ciclo da doença (Figura 7) inicia-se quando o inseto vetor (flebotomíneo), durante um repasto sanguíneo, pica um indivíduo parasitado retirando juntamente com o sangue macrófagos infectados, abrigando formas amastigotas. Após rompimento dos macrófagos, os amastigotas, no intestino do inseto, assumem a forma promastigotas procíclicos, que se multiplicam ativamente por divisão binária. Estes promastigotas, quatro ou cinco dias após o repasto, transformam-se em promastigotas metacíclicos. Nesta fase os parasitas migram para a probóscida do inseto e quando este pica outro vertebrado sadio, inclusive o homem, introduz os promastigotas metacíclicos que serão fagocitados por macrófagos do hospedeiro. Uma vez dentro da célula, os parasitas diferenciam-se originando novamente as formas amastigotas (REY, 2002; NEVES et al., 2005).

A leishmaniose pode provocar quadros de lesões cutâneas, localizadas nas mucosas ou visceras. A forma tegumentar é a mais comum entre as leishmanioses. No Brasil, os principais agentes etiológicos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) são *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e, além dos casos com apresentação clínica clássica, estas espécies são ainda responsáveis por quadros graves e muito resistentes ao tratamento (NEVES et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

A infecção por *L. amazonensis* está relacionada à leishmaniose cutânea difusa, com lesão cutânea papular primária e várias lesões satélites desenvolvendo-se ao redor destas. Formas amastigostas do parasita se disseminam produzindo nódulos cutâneos múltiplos na face e extremidades do corpo. Esta doença ocorre principalmente em áreas da floresta amazônica e a infecção por este parasita vem se tornando cada vez mais frequente devido a crescente ocupação desta região (LAINSON, SHAW, 1987; NEVES et al., 2005; CAMUSET et al., 2007).

Figura 7: Ciclo biológico da leishmaniose

Fonte (adaptado): Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

A LTA é uma das infecções dermatológicas que merece atenção, pelo risco de deformidade que pode produzir no ser humano e pelo envolvimento psicológico, ocorrendo reflexos no campo social e econômico. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (Ministério da Saúde, 2008).

Algumas das profilaxias e controle da leishmaniose envolvem diagnóstico e tratamento dos indivíduos doentes, eliminação dos cães com sorologia positiva e combate ao inseto vetor (NEVES et al., 2005).

O arsenal terapêutico contra leishmaniose é limitado e consiste no uso de fármacos altamente tóxicos. A terapia com antimoniais pentavalentes, como a pentamidina e a anfotericina B, tem sido utilizada por muitos anos, porém podem causar severa toxicidade cardíaca e nefrotoxicidade, além de serem de difícil administração (intravenoso) e de alto custo (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; RATH et al., 2003).

Muitos vegetais apresentam substâncias do metabolismo secundário, entre eles alcalóides, descritos na literatura com atividade leishmanicida (KAM et al., 1999; ROCHA et al., 2005).

1.7.2 Estrongiloidíase

A estrongiloidíase é uma helmintose causada por nematóide do gênero *Strongyloides*. Somente duas espécies são consideradas infectantes para o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, sendo a primeira de maior ocorrência (NEVES et al., 2005). Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas estejam parasitadas por *S. stercoralis* em todo o mundo (GENTA, 1989).

No ciclo do parasita (Figura 8), a forma infectante é a larva filarióide (L3), que está presente no solo ou alimentos contaminados. A L3, após penetrar na pele, cai na corrente sanguínea ou linfática chegando aos pulmões onde sofre duas mudas atingindo o estágio de L5. Após a última muda as larvas saem dos alvéolos, chegam na traquéia e alcançam a faringe, onde a maioria é deglutida indo se alojar no intestino delgado, onde se transformam em fêmeas partenogenéticas parasitas (STRATTON, 2000; NEVES et al., 2005).

Figura 8: Ciclo biológico do *Strongyloides*

Fonte (adaptado): Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

A estrogiloidíase continua sendo expressivo problema entre as helmintíases, principalmente pela capacidade de autoinfecção por parte do agente causal, pela ocasional resistência a erradicação terapêutica, pela dificuldade para eliminar as formas larvárias e pelo risco de hiperinfecção em imunodeprimidos (WHO, 2007).

S. stercoralis não infectam ratos ou outros animais de laboratório e *S. venezuelensis* é usado como modelo de estrogiloidíase em pesquisas (SATO, TOMA, 1990).

1.7.3 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária difundida mundialmente, constituindo-se um grande problema de saúde pública. É endêmica em regiões tropicais e subtropical principalmente nos países da África, Ásia e América Latina. Estima-se que 207 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo. No Brasil, popularmente conhecida por “barriga d’ água”, atinge de 6 a 8 milhões de pessoas. Tal parasitose afeta principalmente indivíduos em áreas rurais e está diretamente associada às condições socioeconômicas da população (MALAGENO, SANTANA, 1994; WHO, 2007; GRYSEELS et al., 2006).

É uma parasitose causada por platelminto trematodo do gênero *Schistosoma*, sendo a espécie *Schistosoma mansoni* mais prevalente e única encontrada no Brasil (JOHSTON, 1993; NEVES et al., 2005).

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico (Figura 9), que se alterna entre dois hospedeiros distintos: hospedeiro intermediário, representado principalmente pelo caramujo do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata* no Brasil), no qual ocorre a reprodução assexuada, e hospedeiro definitivo, vertebrado representado pelo homem, no qual ocorre a fase sexuada da reprodução (NEVES, 2005).

A infecção tem início quando o indivíduo se expõe à água contaminada com a forma larval (cercária) liberada pelo caramujo. As cercárias penetram ativamente na pele e perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos. Os mesmos migram para o sistema sanguíneo ou linfático e chegam ao fígado onde passam para o sistema porta intra hepática e atingem a maturidade sexual. Os machos e fêmeas vivem acasalados e migram até as veias mesentéricas inferiores onde ocorrem a oviposição. Os ovos eliminados nas fezes eclodem em contato com a água liberando o miracídio que penetra o caramujo transformando-se em esporocistos que dão

origem as cercárias, reiniciando o ciclo. Parte dos ovos liberados pelos vermes adultos se alojam na mucosa intestinal e posteriormente nos capilares do sistema porta levando a formação de granulomas ou provocam hemorragias e ulcerações durante a passagem para a luz intestinal. A produção de ovos é o aspecto mais significativo do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose (REY, 2002; SILVA et al., 2002; NEVES et al., 2005).

Figura 9: Ciclo biológico da esquistossomose

Fonte (adaptado): SOBIOLOGIA, 2009

Na infecção por *S. mansoni*, a fase crônica da doença é resultado da resposta do hospedeiro ao acúmulo de ovos no tecido hepático (Figura 10). A resposta das células, induzidas por antígenos presentes nos ovos promove o desenvolvimento de lesões granulomatosas ao redor do ovo (DUNNE, PEARCE, 1999).

Figura 10: Granuloma causado pela deposição de ovos no fígado.

Fonte (adaptado): PEARCE, MACDONALD, 2002

Consequências graves de infecção por *S. mansoni* são resultado de um aumento da pressão arterial portal, uma vez que o fígado torna-se fibrótico, dificultando a passagem sanguínea. Associado a este quadro ocorre também a ascite (acúmulo de líquido na cavidade peritoneal) (PEARCE, MACDONALD, 2002).

A população atingida é tratada após infecção com fármacos existentes, tais como oxamniquina, praziquantel, niridazol entre outros. A não existência de uma vacina, os efeitos colaterais apresentados pela terapia, as falhas na tentativa de erradicar o molusco vetor e o desenvolvimento de resistência do parasita aos fármacos esquistossomicidas faz com que a esquistossomose permaneça como uma das mais prevalentes infecções parasitárias, justificando a continuidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos (REY, 2002; KALIFE et al., 2000).

Em busca de novos constituintes ativos, recentes estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que algumas lignanas dibenzilbutirolactônicas, como a metilcubebina e neolignanas tetraidrofurânicas, como a veraguensina, possuem expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* contra *S. mansoni*, sendo capazes de promover tanto a separação quanto a

morte dos parasitas adultos (macho e fêmea) (PI 0503951-7/Processo FAPESP 04/08784-1).

2. JUSTIFICATIVA

Solasonina e solamargina, presentes em muitas espécies do gênero *Solanum*, podem estar envolvidos em estratégias de inibição da parasitemia em animais silvestres. Como consequência de tal fato, animais dispersores de sementes podem se beneficiar do consumo de frutos contendo esses heterosídeos alcaloídicos. A hipótese de que animais podem se “automedicar” através da estratégia de se alimentar de plantas ou de parte das plantas, tem sido investigada em diversos estudos (HART, 1990; VITAZKOVA, LONG, GLENDINNING, 2001). Considerando que o “lobo-guará” se alimenta principalmente de frutos da “lobeira” para reduzir taxas de parasitismo do nematóide *Diectophyna renale* (COURTENAY, 1994), justifica-se a avaliação dos extratos e substâncias isoladas do “fruto-do-lobo” em ensaios antiparasitários.

Há grande urgência na busca de novos antiparasitários para as doenças negligenciadas, como por exemplo, a leishmaniose, esquistossomose e a esquistossomose, que ainda afetam milhões de pessoas, principalmente as que vivem em regiões pobres, criando um círculo vicioso que não permite o desenvolvimento de tais populações.

Solanum lycocarpum é uma espécie adaptada ao Cerrado brasileiro e produz grande quantidade de frutos (20 a 60 kg de frutos por planta), sendo dessa forma altamente produtiva. Assim, havendo o desenvolvimento de produto comercial, a disponibilidade de matéria-prima não será difícil, considerando, ainda, que em experimentos iniciais observamos que é de fácil cultivo e crescimento rápido, pois após 11 meses as unidades cultivadas floresceram.

Os alcalóides esteroidais presentes em quantidades significativas nesta espécie podem ser utilizados também como fonte para a síntese de esteróides, havendo grande potencial de aproveitamento pela indústria farmacêutica.

Destaca-se, ainda, que os heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina apresentam atividade anticancerígena significativa, podendo servir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer de pele, por exemplo.

A exploração comercial desta espécie ainda disponibilizaria nova alternativa para os agricultores, bem como para a preservação de áreas do Cerrado, tendo em vista o manejo sustentável para exploração dessa espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Investigar o potencial antiparasitário do extrato alcaloídico dos frutos de *S. lycocarpum*, dos heterosídeos alcaloídicos majoritários solamargina e solasonina e da aglicona solasodina.

3.2 Objetivos específicos:

- Obter o extrato alcaloídico a partir dos frutos de *S. lycocarpum*;
- Isolar os heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina e a aglicona solasodina;
- Desenvolver método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da solamargina, solasonina e solasodina;
- Identificar os alcalóides utilizando-se método espectroscópico (ressonância magnética nuclear - RMN) e espectrometria de massas (EM);
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* em células da linhagem LLCMK₂ do extrato alcaloídico e compostos isolados;
- Realizar ensaios antiparasitários *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizando diferentes concentrações do extrato alcaloídico e compostos isolados;
- Avaliar a atividade do extrato alcaloídico *in vitro* contra vermes adultos de *Strongyloides venezuelensis*;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e no desenvolvimento de ovos;
- Realizar ensaio *in vivo* contra *S. mansoni* utilizando diferentes concentrações do extrato alcaloídico;
- Realizar cortes histológicos dos fígados dos animais estudados *in vivo* para a atividade esquistossomicida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos de *S. lycocarpum*

Foram coletados cerca de 30 kg de frutos maduros nativos da região do Cerrado, na cidade de Cajuru - São Paulo, em janeiro de 2008. Uma exsicata foi depositada como documento taxonômico no herbário do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP sob o número de registro SPFR: 11638, sendo identificada pelo Prof. Dr. Milton Groppo Júnior da FFCLRP-USP.

Os frutos coletados foram picados e submetidos à secagem em estufa de ar quente e circulante a 45°C. Após secagem, o material vegetal foi pulverizado em moinho de martelo. O pó resultante (droga vegetal) foi armazenado a - 4°C até a extração.

4.2 Preparo do extrato alcaloídico

Objetivando a obtenção de um extrato rico em heterosídeos alcaloídicos, optou-se por uma extração seletiva de alcalóides: extração ácido-base. Este processo foi realizado segundo metodologia de Henriques et al. (2004) e patente de Kuo (2000) adaptadas.

Oito quilos e noventa e sete gramas do material vegetal moído foram transferidos para um tanque de extração de 35L de capacidade com sistema de agitação. Para a extração aquosa ácida utilizou-se ácido clorídrico concentrado até atingir o pH 2, deixando o material em maceração pelo período de 24 h. Filtrou-se e alcalinizou-se o filtrado até pH 10 utilizando hidróxido de sódio 6 M. Com a alcalinização do meio formou-se um precipitado, o qual foi separado por centrifugação e, posteriormente, seco em estufa de ar circulante a 45°C.

O precipitado, após a secagem, foi triturado, suspenso em etanol e filtrado. Este procedimento foi repetido até esgotamento da fração do extrato bruto solúvel em etanol. A fração etanólica foi concentrada a vácuo e liofilizada.

4.3 Caracterização físico-química dos frutos desidratados

4.3.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado em um sistema de infravermelho SI4040 GEHAKA, acoplado a uma balança digital BG200. O teor da umidade foi obtido através da média de três determinações em 1g da amostra pulverizada, como descrito na A.O.A.C. (1995).

4.3.2 Determinação das cinzas totais

Cadinhos foram previamente calcinados em mufla a 600°C por 1h. Após essa operação, 1g da amostra pulverizada foi colocada em um cadinho e levado a mufla, por 4h, com elevação da temperatura até 600°C (MATOS, 1997). O valor de cinzas totais foi obtido através da média de três determinações.

4.4 Isolamento e análise dos heterosídeos alcaloídicos

4.4.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Para as CCDC utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) (art 107730). As placas utilizadas apresentavam espessura de 0,25 mm.

4.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Para as CCDP utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) (art 1077472500). As placas utilizadas apresentavam espessura de 1,0 mm.

4.4.3 Otimização de fase móvel para cromatografia em camada delgada (CCDC)

A partir do extrato alcaloídico iniciou-se o desenvolvimento da fase móvel da CCDC. Para tanto, utilizaram-se os solventes acetato de etila (AcOEt), clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH), butanol (BuOH), água (H_2O) e modificadores de fase, tais como ácido acético (CH_3COOH) e hidróxido de amônio (NH_4OH).

Foram testadas as fases móveis encontradas na literatura como CHCl_3 : MeOH: NH_4OH (2:2:1) (WEISSENBERG, 2001), CHCl_3 : MeOH: H_2O : NH_4OH (7: 3: 0,4:0,05) e BuOH: H_2O : NH_4OH (5: 4:1) (WAGNER, 1999) e CHCl_3 : MeOH: H_2O : NH_4OH (63: 40: 2: 0,5) (STAHL, BOLLINGER, 1965), entre outras.

Após escolha da melhor fase móvel, visando à substituição do solvente organoclorado, foram realizados testes para substituição do clorofórmio pelo acetato de etila. As placas foram reveladas com anisaldeído (revelador universal) e Dragendorff (específico para alcalóides).

4.4.4 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O desenvolvimento do método analítico cromatográfico foi realizado em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência da marca *Shimadzu*, equipado com controlador SCL-10Avp, e três bombas LC-10AD, detector de UV modelo SPD - M10Avp e sistema controlador computadorizado com software *Shimadzu Class-VP* versão 5.02.

Para tal desenvolvimento foram considerados métodos analíticos publicados para heterosídeos alcaloídicos como por Crabbe e Fryer, (1980), Edwards e Cobb (1996), Abreu et al., (2007) e Eanes et al., (2008), os quais foram utilizados com modificações.

Para os testes de eficiência na separação dos compostos de interesse foram empregadas diversas colunas.

No desenvolvimento analítico foram empregados ACN, MeOH, THF, isopropanol em grau CLAE de pureza da marca *J. T. Baker* e água purificada pelo sistema de filtro *Milli-Q-Plus* da *Millipore*. Os modificadores de fase foram ácido acético, ácido trifluoracético e ácido fórmico da marca *Synth*. Foram testados os

tampões trishidroximetilaminometano (Tris) (*Synth*) e tampão fosfato (*Merck*), ambos na concentração de 0,01M.

No desenvolvimento do método cromatográfico, foram testadas condições cromatográficas no modo isocrático e gradiente. Avaliou-se também o efeito da vazão da fase móvel e do pH do tampão empregado.

Para a escolha da coluna e fase móvel foram considerados a resolução dos picos e o tempo de retenção dos marcadores.

O método analítico selecionado foi validado pela aluna de mestrado Renata Fabiane Jorge Tiossi.

4.4.5 Cromatografia *flash* do extrato alcaloídico

O extrato alcaloídico (1,6 g) foi submetido à cromatografia *flash*, de acordo com metodologia descrita por Still, Kahn, Mitra (1978). Utilizaram-se 283 g de sílica gel 60 (0,040-0,063mm) (*Merck*) (art 1093851000) empacotada em coluna de vidro de 52 cm de altura e 5 cm de raio, da qual foram coletadas 85 frações em um vazão de 15 mL/min, utilizando fase móvel isocrática de AcOEt : MeOH : H₂O : NH₄OH (63 : 40 : 2 : 0,3), sendo as frações reunidas de acordo com a análise em CCDC. As que demonstraram ter um dos heterosídeos alcaloídicos de interesse majoritariamente foram purificadas por CLAE preparativa.

4.4.6 Cromatografia preparativa em CLAE

As uniões das frações 31-45 (0,698 g) e 58-70 (0,501 mg) isoladas da coluna *flash*, feita com o extrato alcaloídico, foram purificadas por CLAE acoplado ao detector UV/ vis (SPD-20 A (*Shimadzu*)) e software LC solution versão 1.1.

Utilizou-se coluna cromatográfica preparativa de fase reversa (*Shimadzu* - CLC-ODS (M) C₁₈, 20 mm x 250 mm, com partículas de 5 µm), vazão de 8 mL/min e como fase móvel uma mistura de ACN : H₂O com 0,01% de TFA (3:7). Várias injeções foram feitas para obtenção dos heterosídeos alcaloídicos isolados.

4.4.7 Cromatografia de camada delgada preparativa

O extrato alcaloídico (15 mg), solubilizado em metanol foi aplicado em uma placa preparativa (20x20 cm) previamente eluída com acetona.

A eluição foi realizada com a fase móvel desenvolvida para CCDC, AcOEt: MeOH: H₂O: NH₄OH (63:40:2:0,3). Foram testadas as condições de temperatura que pudessem proporcionar melhor resolução das amostras. O experimento foi realizado em temperaturas, aproximadas, de 20 °C (sala climatizada) e 30 °C. Após a eluição as placas foram reveladas com vapor de iodo e as bordas com anisaldeído.

O processo foi repetido por inúmeras vezes. A extração dos compostos da sílica foi realizada pela adição de MeOH:AcOEt (9:1) grau CLAE e ultrassom por 10 min. As amostras foram filtradas em placa sinterizada e concentradas em rotaevaporador.

A pureza dos padrões isolados foi verificada inicialmente por CCDC, posteriormente por CLAE-DAD, analisadas em espectrômetro de massas e por RMN.

4.4.8 Isolamento da aglicona solasodina

O isolamento da solasodina foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Weissenberg (2001) adaptada.

O extrato alcaloídico (6 g) foi refluxado por 8h em MeOH acidificado (pH=1) com HCl concentrado. Após resfriamento, a solução foi alcalinizada com NaOH 6M e particionada com AcOEt. A fase orgânica contendo, a aglicona, foi rotaevaporada e liofilizada produzindo uma massa de 2,01 g. Essa massa foi submetida à cromatografia em coluna clássica empregando coluna de vidro de 76 cm de altura e 6 cm de diâmetro, utilizando sílica gel (60 – 200 mesh) como fase estacionária. Foram coletadas 70 frações de 25 mL cada, utilizando como eluente mistura de AcOEt e MeOH, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Frações obtidas para o isolamento da solasodina

Eluentes	Frações
AcOEt 100%	1 a 10
AcOEt : MeOH (8:2)	11 a 20
AcOEt : MeOH (6:4)	21 a 39
AcOEt : MeOH (4:6)	40 a 50
AcOEt : MeOH (2:8)	51 a 59
MeOH 100%	60 a 70

4.4.9 Análise por espectrometria de massas dos compostos isolados

As amostras foram solubilizadas em metanol e analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução. Para melhor desempenho da análise utilizou-se a calibração interna pelo padrão NA-TFA (10 µg/mL). Tais análises foram realizadas em espectrômetro de massas UltrOTOF (*Bruker Daltonics*) com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo QqTOFq (quadrupolo e tempo de voo em sequência), modo de detecção positivo.

Em relação às condições de análises do aparelho, a vazão da amostra foi de 150 µL/h, com End Plate: 4000 V, Capillary: 4500 V, Capillary Exit: 300 V, Skimmer 1: 55 V, Skimmer 2: 25, Transfer: 90 µs e Collision Exit Gate: 60 µs.

As análises por espectrometria de massas forneceram as massas experimentais dos compostos. Através destas, pode-se calcular os erros de identificação considerando-se as respectivas massas teóricas dos compostos em questão. Dessa forma, calcularam-se os erros segundo a equação (Instituto de Química da Unicamp, 2009):

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{massa teórica} - \text{massa experimental}}{\text{massa teórica}} \times 1000$$

4.4.10 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN) dos compostos isolados

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro *Brucker – Avance* DRX 400, operando a 500 MHz para obtenção do espectro de hidrogênio (¹H), COSY, HMBC e HMQC. Utilizou-se MeOH deuterado (*Merck*) para solubilização dos

compostos isolados. Os dados foram obtidos no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico e dos compostos isolados em células LLCMK₂

Células da linhagem LLCMK₂ (linhagem de células de fibroblastos) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma*) suplementado com 5 % de soro bovino fetal (*Cultilab*), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 µg/mL) e ciprofloxacina (10 µg/mL). Os cultivos foram mantidos a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂, sendo o meio renovado a cada três dias.

A ação citotóxica das substâncias foi avaliada pelo método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), conforme Sieuwerts et al. (1995).

Em microplacas de 96 poços foram adicionadas 1x10⁶ células/mL da linhagem LLCMK₂ em cada poço. As substâncias foram testadas nas seguintes concentrações: 0,5; 2; 8; 32; 64 e 128 µg/mL para o extrato alcaloídico (EA) e 0,5; 2; 8; 32; 64 e 128 µM para solamargina (SM), solasonina (SS), solasodina (SD) e mistura equimolar (SS+SM). As placas foram incubadas por 24 e 72 h em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂.

Após estes períodos adicionaram-se 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 4 h. Decorrido tal período, adicionou-se 90 µL de isopropanol (100 µL de isopropanol em 336 µL de HCl concentrado) em cada poço e mantiveram-se as placas em temperatura ambiente por 1 h para que os cristais resultantes da reação solubilizassem.

A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (*Sunrise Tecan*) no comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle positivo utilizou-se apenas meio RPMI e como controle negativo, meio com células e dimetil sulfoxido (DMSO), solvente utilizado para a solubilização das substâncias.

A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidade} = 100 - \left\{ \left[\frac{(Y-CP)}{(CN-CP)} \right] \times 100 \right\}$$

Onde:

Y= leitura da absorbância nos poços com células em diferentes concentrações das substâncias

CN= leitura da absorbância dos poços com células (controle negativo)

CP= leitura da absorbância dos poços apenas com meio RPMI (controle positivo)

A dose citotóxica para 50 % das células (CI₅₀) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

4.5.2 Avaliação da atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

A avaliação da atividade leishmanicida das amostras foram realizadas *in vitro*, no laboratório de parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, frente às formas promastigostas de *Leishmania amazonensis*. O meio de cultura utilizado para a manutenção dos parasitas foi o meio 199 (LGC) suplementado com 5 % de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina, sendo a cultura mantida em estufa a 22 °C.

As formas promastigotas (1x10⁵ parasitas/mL), obtidas do cultivo em fase logarítmica foram colocadas em placas de 96 poços a 22^o C, onde diferentes concentrações das substâncias (0,5, 2, 8; 32; 64 e 128 µM para compostos isolados (SS, SM, SS+SM, SD) e 0,5, 2, 8; 32; 64 e 128 µg/mL para o EA) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 e 72h.

Após cada período, 50 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. Em seguida, as placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 4 h. Após este período, adicionou-se 50 µL de isopropanol acidificado em cada poço e as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 1 h.

A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (*Sunrise Tecan*) no comprimento de onda de 570 nm. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina e, como controle negativo, utilizou-se meio com parasita e DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de lise (% lise) de acordo com a seguinte fórmula, para a técnica de oxidação por MTT:

$$\% \text{ lise} = 100 - \{[(Y-CP)/(CN-CP)] \times 100\}$$

Onde:

Y= leitura da absorbância dos poços com parasitas em diferentes concentrações das substâncias testadas

CN= leitura da absorbância dos poços com meio de cultura e parasita (controle negativo)

CP= leitura da absorbância dos poços contendo apenas meio de cultura (controle positivo)

A dose citotóxica para 50 % dos parasitas (CI_{50}) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

4.5.3 Análise dos dados

Para análise dos resultados de citotoxicidade e atividade leishmanicida utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5 Updater*. A partir do programa foram construídas as curvas sigmoidais dose-resposta, onde foram calculados os valores de CI_{50} , a porcentagem de lise e o desvio padrão dos valores obtidos pela atividade das substâncias testadas.

4.5.4 Atividade *in vitro* do extrato alcaloídico sobre *Strongyloides venezuelensis*

O ensaio *in vitro* do extrato alcaloídico contra *Strongyloides venezuelensis*, foi realizado no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Biologia - UNICAMP, pela professora Dr^a. Silmara Marques Allegretti e a pela aluna de mestrado Letícia Aparecida Duart Bastos.

Fêmeas adultas do *S. venezuelensis* foram obtidas a partir da secção de 15cm do intestino delgado de um rato com 15 dias de infecção. Este segmento do intestino foi lavado em solução estéril de NaCl 0,9% e mergulhado no meio RPMI acrescido de antibiótico, permanecendo na estufa a 37° C por 1 h.

O extrato alcaloídico foi pesado e diluído em solução tampão PBS para obter 4 diferentes concentrações testadas nos poços: D1 (2,0 mg/mL), D2 (1,0 mg/mL), D3 (0,5 mg/mL) e D5 (0,25 mg/mL).

Foram distribuídos 1,8 mL do meio RPMI/antibiótico em cada poço da placa de cultura, acrescentando 200 µl das diferentes concentrações de extrato a ser testada. O ensaio foi realizado em triplicata e utilizou-se como grupo controle o meio RPMI, sem a adição do extrato.

O procedimento foi realizado em câmara de fluxo e, em cada poço da placa de cultura, foram inseridas duas fêmeas adultas do *S. venezuelensis*. A placa foi incubada a 37° C com 5% de CO₂ e observada por um período de 72 h.

As leituras, realizadas em microscópio invertido, foram feitas de hora em hora até completarem 6 horas e após 12 h, 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Os critérios de avaliação foram: motilidade, ovoposição e morte. A motilidade dos vermes foi classificada em ausência de movimentação (-); baixa movimentação (+); movimentação moderada (++) e movimentação intensa (+++).

4.5.5 Ensaio Esquistossomicida

4.5.5.1 Manutenção do ciclo de *S. mansoni*

O ciclo de *S. mansoni* linhagem LE (Linhagem Evangelista) é mantido no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP, utilizando camundongos das linhagens Swiss ou Balb/c como hospedeiros definitivos e caramujos da espécie *B. glabrata* como hospedeiros intermediários. Os ovos foram retirados das fezes de camundongos infectados e expostos à luz por 1 h. Os miracídios liberados dos ovos foram utilizados para a infecção dos caramujos (HACKETT, 1993). As cercárias liberadas 43 dias após infecção dos caramujos pelos miracídios foram coletadas e usadas para infectar os camundongos.

Os camundongos foram infectados por via subcutânea, com aproximadamente 200 cercárias e, após oito semanas, foram mortos e a cavidade abdominal e torácica abertas de forma asséptica. Os casais de parasitas adultos foram recuperados do sistema porta-hepático, lavados com meio RPMI 1640 tamponado com HEPES 20 µM, pH 7,5, suplementado com penicilina (100 UI/mL),

estreptomicina (100 µg/mL) e 10 % de soro bovino fetal e colocados em placas de *Petri* estéril (SMITHERS, TERRY, 1965).

4.5.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade do extrato alcaloídico e compostos isolados em vermes adultos e no desenvolvimento de ovos de *Schistosoma mansoni*

Casais de vermes adultos foram recuperados de camundongos Balb/c ou Swiss, via perfusão do sistema porta-hepático em condições assépticas, como descrito no item 4.5.5.1.

Posteriormente, um casal de verme adulto foi transferido para cada poço em uma placa de cultura de 24 poços contendo o mesmo meio descrito anteriormente e incubados a 37 °C na presença de 5 % CO₂. Após 24 h de incubação dos casais de vermes adultos, o extrato alcaloídico e os compostos isolados previamente dissolvidos em 0,1 % de DMSO foram adicionados ao meio testando-se as seguintes concentrações: EA: 50, 32, 20, 8 e 0,5 µg/mL; SM, SS e SS+SM: 50, 32, 20, 8 e 0,5µM; SD: 50 µM. Os parasitas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente e monitorado por 24 e 120 h usando microscópio invertido para avaliar as condições gerais dos parasitas como: pareamento, taxa de mortalidade, atividade motora, alteração no tegumento e número de ovos (KNOBLOCH et al., 2006; XIAO et al., 2007; MAGALHÃES et al. 2009).

Como controles negativo foram utilizados parasitas mantidos em meio RPMI 1640 e meio RPMI 1640 com 0,1 % de DMSO. Como controle positivo, utilizou-se vermes adultos incubados com 10 µM (3,12 µg/mL) de praziquantel. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, sendo avaliados quatro casais de vermes por concentração em cada experimento.

Para verificar o desenvolvimento dos ovos, casais de vermes adultos foram incubados por 48 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, os parasitas foram removidos dos poços de cultura com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. No meio de cultura, contendo os ovos, adicionou-se o EA (10 e 15 µg/mL), SM (10, 15 e 20 µM), SS (20 e 50 µM) e SS+SM (10 e 15µM). Os ovos foram incubados por 120 h nas mesmas condições, e após este período, o desenvolvimento dos ovos foi avaliado como descrito por Michael e Prata (1968) com o auxílio de um microscópio invertido. As imagens foram capturadas por

câmera Olympus 200 acoplada ao microscópio. Foram realizados quatro experimentos independentes. Utilizou-se como controle negativo meio RPMI 1640 e meio com 0,1 % de DMSO (MAGALHÃES et al. 2009).

4.5.4.3 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* do extrato alcaloídico

Para este ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Sayed et al. (2008) com adaptações. O Protocolo do Comitê de Ética para realização desse ensaio foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do campus da USP de Ribeirão Preto (Protocolo nº 08.1.1091.53.0).

Camundongos Swiss fêmeas com peso entre 17 a 20 g foram infectados com 100 cercárias por via subcutânea. Os animais foram divididos em caixas com 5 animais, sendo utilizado 15 camundongos para cada grupo. Avaliou-se a atividade esquistossomicida *in vivo* nas diferentes fases do ciclo do parasita administrando o extrato alcaloídico por via oral da seguinte forma:

Grupo A: um dia após infecção para avaliar a atividade sobre as fases presentes na pele e pulmonar (esquistossômulos);

Grupo B: vinte e três dias após infecção para avaliar a atividade sobre a fase de vermes jovens;

Grupo C: trinta e sete dias após infecção para avaliar a atividade sobre a ovoposição e vermes adultos;

Grupo D: quarenta e cinco dias após infecção para avaliar a atividade sobre a fase crônica (granulomas no fígado).

Esquema dos tratamentos nas diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*:

Para todos os tratamentos, o extrato alcaloídico foi administrado diariamente por 5 dias consecutivos por via oral. Cada subgrupo (n=5 para cada) recebeu no final dos tratamentos as seguintes concentrações do extrato alcaloídico: 50 mg/Kg (subgrupos: A1, B1, C1 e D1), 100 mg/Kg (subgrupos: A2, B2, C2 e D2) e 200 mg/Kg (subgrupos: A3, B3, C3 e D3).

Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução aquosa contendo 0,7 % de Tween 80 veículo utilizado na solubilização do extrato alcaloídico. Um grupo de camundongos não infectados também foi utilizado como controle.

Como controle positivo utilizou-se praziquantel na concentração de 60 mg/kg/dia, por 5 dias consecutivos, sendo administrado apenas na fase crônica (45^o ao 50^o dia) do tratamento, uma vez que estudos comprovam que sua atuação ocorre apenas sobre os vermes adultos provocando sua morte por paralisia muscular (ARAGON et al. 2009; KEISER et al., 2009).

Após 55 dias de infecção, todos os camundongos foram mortos. Os vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático por perfusão, colocados em meio RPMI 1640 para serem contados (casais, machos e fêmeas).

Os fígados e baços de todos os camundongos foram coletados e pesados. Um pequeno pedaço de cada fígado foi pesado e digerido com solução de KOH (4%) em PBS a 37 °C, sob agitação constante, por aproximadamente 12 h (CHEEVER, 1968). O conteúdo obtido após a digestão foi colocado sobre uma lâmina de vidro e o número de ovos contados por microscopia, em duplicata. A redução de ovos em grama de fígado foi calculado de acordo com Wang et al. (2008) utilizando seguinte fórmula:

$$RO (\%) = \frac{MNO/gfGC - MNO/gfGE}{MNO/gfGC} \times 100$$

Sendo que RO(%) = Porcentagem de redução de ovos; MNO/gfGC = Média do número de ovos/grama de fígado no grupo controle; e MNO/gfGE = Média do número de ovos/grama de fígado no grupo tratado.

4.5.5.4 Análises histológicas

Pedaços de fígados dos animais foram fixados em solução de formol 10%, processados para blocos de parafina, seccionados (4 mm de espessura), corados

com hematoxilina-eosina (HE) e examinados com auxílio de um microscópio binocular (*Carl Zeiss, Axiostar, Alemanha*) com aumento de 10 vezes. Os granulomas causados pela presença dos ovos no fígado foram contados em vinte campos sucessivos de cada fígado utilizando a objetiva de baixa potência (aumento de 10 vezes). A quantidade de granulomas foi estimada pelo cálculo do número de granulomas/mm² de secção de tecido do fígado utilizando ocular graduada de 6,4mm² (*Zeiss*) (HURST, WILLINGHAM III, LINDBERG, 2000; HELMY, MAHMOUD, FAHMY, 2009). No mínimo 10 granulomas contendo pelo menos um ovo em seu interior, foram observados para calcular a medida dos granulomas nos diferentes grupos de animais utilizando uma ocular graduada (*Zeiss*). O raio do maior diâmetro do granuloma e o raio perpendicular a ele foram medidos, utilizando um micrômetro ocular. A área do granuloma foi calculada pela seguinte fórmula (HURST, LOLA, LINDBERG, 2006):

$$\text{Área} = \pi \times R1 \times R2$$

Onde: $\pi = 3,14$; R1= raio 1; R2 = raio 2

4.5.5.5 Análise estatística para os ensaios esquistossomicidas

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* (desenvolvimento dos ovos) e *in vivo* (número de ovos, número de granulomas/fígado e número de parasitas) foram comparados pela análise de variância, *one-way* Anova, seguida pela determinação da significância entre o grupo controle negativo e os tratados (pós-teste *Dunnett*). Para todos os testes, o nível crítico fixado foi de 5 % ($P < 0.05$) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significativa. Os testes foram realizados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad software, USA*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção do extrato alcaloídico

A partir da extração ácido/base de 8,097 kg dos frutos obteve-se rendimento de 19,27 % de precipitado.

Realizou-se uma solubilização exaustiva em etanol com 100 g do precipitado obtendo-se rendimento de 7,76 % do extrato alcaloídico a partir do precipitado. Considerando o rendimento em relação a biomassa da droga vegetal, obteve-se 1,23% de extrato alcaloídico. Schwarz et al (2007) relataram rendimento de 1,85% de alcalóides totais no fruto do lobo. Entretanto, o processo de extração realizado no presente estudo foi realizado em grande escala, uma vez que se trabalhou com extrator de 35 L de capacidade. Desta forma, considerando a grande manipulação dos volumes de extração e precipitado, é possível que tenha ocorrido perda de material durante o processo.

Além disso, o material vegetal utilizado foi coletado de indivíduos diferentes, de locais diferentes e em épocas diferentes. Portanto, estes e outros fatores podem influenciar no conteúdo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

5.2 Avaliação do teor de umidade e cinzas totais

Os teores médios de cinzas totais e umidade do extrato alcaloídico obtidos a partir dos frutos de *S. lycocarpum* foram 2,52 % e 4,72 %, respectivamente.

Os teores médios de cinzas totais permitem a verificação da presença de impurezas inorgânicas não voláteis, que podem ser contaminantes, tais como terra e areia procedentes de uma manipulação incorreta durante o beneficiamento da planta. O teor estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 % e 14 % (FARIAS, 2004). Já a determinação do teor de umidade em amostras vegetais é de suma importância uma vez que, valores elevados permitem a ação de enzimas da própria planta podendo degradar princípios ativos além de favorecer o crescimento de microrganismos (OLIVEIRA et al., 1996).

5.3 Desenvolvimento de fase móvel para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Com o intuito de se obter a melhor fase móvel para separação dos compostos presentes no extrato alcaloídico, foram testadas inúmeras fases móveis. Na figura 11 apresentam-se algumas das fases móveis testadas.

Para a aglicona, solasodina, a melhor fase móvel foi AcOEt: MeOH: NH₄OH (60: 40: 0,3).

Figura 11: Perfis na CCDC das frações alcaloídicas: (A) CHCl₃: MeOH: NH₄OH (2:2:1) e (B) AcOEt: MeOH: H₂O: NH₄OH (63: 40: 2: 0,3).

Pode-se verificar que apesar da aparente semelhança entre as fases móveis, nota-se que aquela representada pela figura (B) possibilitou maior resolução das substâncias, inclusive de outros compostos minoritários. Destaca-se que, com intuito de reduzir o uso de solventes clorados, substituiu-se o clorofórmio por acetato de etila sem significantes alterações nos perfis, uma vez que este último tem polaridade próxima à do primeiro. Neste experimento foram determinados os R_fs da solamargina (0,625) e da solasonina (0,407).

5.4 Desenvolvimento de método analítico por CLAE

Com objetivo de encontrar melhores condições cromatográficas que propiciariam os melhores parâmetros de análise dentro do menor tempo possível,

foram investigadas diversas condições cromatográficas como colunas, fase móvel, vazão e modo de eluição (gradiente ou isocrático).

Neste sentido, os melhores resultados obtidos foram utilizando: coluna Zorbax SB-C₁₈ (Agilent), com dimensões de 4,6 x 250 mm com partículas de 5 µm; modo isocrático de eluição utilizando fase móvel constituída de ACN: tampão fosfato 0,01M (35:65); vazão de 1 mL/min; 20 µl de injeção e tempo de eluição de 20 min.

Em relação à seleção do comprimento de onda de análise a melhor detecção ocorreu em 200 nm. Justifica-se o uso deste baixo comprimento de onda em razão dos compostos possuírem apenas um grupo cromóforo (uma ligação dupla). Tal fato implicou na dificuldade de utilizar solventes, como por exemplo, MeOH, que também absorvem em baixo comprimento de onda.

Na figura 12 está representado o cromatograma do extrato alcaloídico utilizando as condições descritas acima para a análise.

Figura 12: Cromatograma do extrato alcaloídico por CLAE, 200 nm, nas condições estabelecidas para análise. (SS - Tr = 9 min/ SM – Tr = 12 min)

Os resultados obtidos para quantificação da droga vegetal (pó dos frutos) e do extrato alcaloídico encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Análise quantitativa da droga vegetal e do extrato alcaloídico (g/100g de material seco ± DP)

Amostra	SS	SM
Droga vegetal	1,04 ± 0,01	0,69 ± 0,00
Extrato alcaloídico	45,09 ± 1,14	44,37 ± 0,60

A soma dos teores de solasonina e solamargina no extrato alcaloídico resultou em 89,46 % desses no extrato alcaloídico, o que demonstra que o método desenvolvido para extração de tais compostos é bastante seletivo.

5.5 Isolamento

5.5.1 Cromatografia *flash* do extrato alcaloídico

Os resultados obtidos da coluna *flash* realizada com o extrato alcaloídico, seguindo a metodologia descrita por Still, Kahn, Mitra (1978), permitiu a obtenção dos heterosídeos alcaloídicos separadamente. A união das frações 31-45 (698 mg) demonstrou a presença de solamargina e as frações 58-70 (501 mg) a presença de solasonina quando avaliadas em CCDC. Porém, quando analisados em CLAE analítico, a porcentagem de pureza da área do pico não demonstrou teor satisfatório havendo a presença de outros constituintes com tempo de retenção (Tr) diferente do composto de interesse sendo necessário repurificação das frações em CLAE preparativo.

5.5.2 Cromatografia preparativa em CLAE

Da união das frações 31-45 e 58-70, injetaram-se 374 mg e 269 mg, respectivamente para repurificação por CLAE preparativo, obtendo-se rendimento de 30,29 % (113,3 mg) de solamargina e 12,86 % (34,6 mg) de solasonina.

Para o isolamento dos compostos de interesse em CLAE preparativo foi necessário o desenvolvimento de nova fase móvel, uma vez que a fase móvel previamente desenvolvida para análise em CLAE-DAD do extrato alcaloídico continha em sua composição tampão, o que dificultaria a purificação dos compostos. Logo utilizamos as seguintes condições cromatográficas para este isolamento: coluna: CLC-ODS (M) 5 µm, 250 x 20 mm. Fase móvel: ACN: H₂O (3:7) com 0,01% de TFA, vazão: 8 mL/min e detecção em 200 nm.

Após separação, os compostos obtidos foram analisados por CLAE-DAD e apresentaram os perfis a seguir (Figura 13).

Figura 13: Perfil cromatográfico dos compostos isolados por CLAE preparativo. (A) solamargina (Tr = 12 min) e (B) solasonina (Tr = 9 min)

5.5.3 Cromatografia de camada delgada preparativa

Em uma placa preparativa eluída a temperatura de 30 °C, observou-se que as manchas não ficaram bem resolvidas (muito próximas). Porém, quando realizada com eluição a 20 °C, ocorreu boa separação (Figura 14).

Figura 14: Eluição do extrato em CCDP a 20 °C/ R_f (Somargina)= 0,576; R_f (Solasonina)= 0,385

Após eluição das placas e revelação com vapores de iodo os R_f s obtidos para solasonina e solamargina foram, 0,385 e 0,576, respectivamente

O rendimento a partir de 15 mg do extrato alcaloídico aplicado na placa foi de 9,3 % (1,4 mg) para solamargina e de 15 % (2,25 mg) para a solasonina.

As massas obtidas foram analisadas por CCDC e por CLAE-DAD. As frações que apresentaram área do pico superior a 92 % foram analisadas por espectrômetro de massas para confirmação da identidade dos compostos.

A técnica de isolamento por CCDP é trabalhosa, dispendiosa e até obtenção da substância final podem ocorrer muitas contaminações da amostra. Porém, foi uma das técnicas que permitiu a separação dos dois heterosídeos alcaloídicos de interesse.

5.5.4 Isolamento da aglicona solasodina

A partir de 6 g do extrato alcaloídico hidrolisado e particionado com AcOEt obtiveram-se 2,01 g (rendimento de 33%) de aglicona com impurezas. Tal massa foi submetida em coluna clássica para purificação. A eluição da solasodina ocorreu na fase móvel AcOEt : MeOH (6:4) nas frações 21 a 39 produzindo rendimento de 19 % ($m = 1,1392$ g) a partir do extrato alcaloídico inicial.

Posteriormente, a pureza da substância foi analisada em CCDC utilizando como fase móvel AcOEt : MeOH : NH_4OH (60:40:0,3), em espectrômetro de massas e em CLAE-DAD (Figura 15).

Figura 15: Análise da solasodina em CLAE-DAD sobreposta com o cromatograma de injeção do MeOH. Condições cromatográficas: fase móvel isocrática ACN: tampão fosfato 0,01M (7:3); vazão de 1 mL/min; λ 200 nm; coluna Zorbax SB-C₁₈.

5.6 Análise dos compostos isolados por espectrometria de massas

As análises por espectrômetro de massas fornecem dados sobre os fragmentos gerados pela quebra da molécula do analito durante a análise. Desse modo, é possível a identificação dos compostos pela interpretação dos íons gerados pela fragmentação no eletrospray (ESI).

Os espectros de massas obtidos para solasonina, solamargina e solasodina encontram-se nos apêndices 1, 2 e 3, respectivamente.

No espectro de massas da solasonina (Apêndice 1) encontramos como pico base o íon m/z 884, referente à molécula protonada $[M+H]^+$. A presença dos íons m/z 738, 722 e 576 no espectro indicam a perda de uma molécula de ramnose, uma molécula de glicose e a perda de ramnose e glicose simultaneamente, respectivamente. Estes dados corroboram com os encontrados por Distil e Wink (2009). Tais fragmentações podem ser observadas na figura 16.

Figura 16: Fragmentação da molécula de solasonina por ESI

O pico base encontrado para a solamargina no espectro de massas MS/MS (Apêndice 2) foi o íon m/z 868, referente a molécula protonada $[M+H]^+$ e o íon m/z 850 refere-se a perda de uma molécula de água $[M+H - H_2O]^+$.

Para a aglicona solasodina, a presença do íon m/z 396 no espectro de MS/MS (Apêndice 3) obtido a partir da fragmentação da molécula protonada com m/z 414, indica também a molécula protonada desidratada $[M+H - H_2O]^+$ (Figura 17).

Figura 17: Desidratação da molécula de solasodina

As análises por espectrometria de massas indicam a massa dos compostos mais abundantes na amostra. Desse modo, suas identidades foram indicadas pela

comparação da massa experimental com a massa teórica. Para tal, foi calculado o erro de cada composto (Tabela 03).

Tabela 3: Relação dos compostos e seus respectivos erros relativos

Composto	Massa teórica	Massa experimental	Erro (ppm)
Solasonina	884,5012	884,0807	0,47
Solamargina	868,0813	868,5018	0,48
Solasodina	414,3405	414,3366	0,01

Considerando-se que os valores de erro permitidos são de 50 ppm (Instituto de Química da Unicamp, 2009), pode-se dizer que os compostos isolados correspondem a solasonina, solamargina e a solasodina.

5.7 Análise dos compostos isolados por ressonância magnética nuclear

A caracterização dos compostos isolados foi realizada através da aquisição dos espectros de RMN mono e bidimensionais. Os espectros de RMN bidimensionais, HMQC, HMBC e COSY, mostram as correlações entre hidrogênios e carbonos ligados diretamente, hidrogênios e carbonos distantes em até três ligações, e hidrogênios acoplando com hidrogênios vizinhos, respectivamente (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007). Desta forma, as estruturas puderam ter sua identidade confirmada com base em informações obtidas conjuntamente por essa e outras técnicas.

Os espectros de RMN de hidrogênio obtidos para a solasodina (SD), solasonina (SS) e solamargina (SM) encontram-se nos apêndices 4, 6 e 11, respectivamente. Os apêndices 5, 10 e 15 representam os mapas de contorno HMQC, da SD, SS e SM, respectivamente.

Os dados da tabela 4 mostram os valores obtidos neste trabalho para os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono do núcleo esteroidal dos compostos isolados. Estes dados encontraram-se de acordo com os descritos na literatura (PURI, WONG, 2003; ZHAH, et al., 2007) para a RMN de hidrogênio e para os espectros bidimensionais.

Tabela 4: Dados de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD , δ ^1H (multiplicidade) e HMQC

<i>Posição dos átomos</i>	<i>δ ^1H obtidos</i>	<i>δ ^1H literatura ^{a, b}</i>	<i>δ ^{13}C/HMQC obtidos</i>
1	1,09; 1,88 (q)	1,00; 1,80 ^b	38,64
2	1,49 ; 1,79 (m)	1,40; 1,78 ^b	32,41
3	3,38 (m)	3,52 (m) ^a ; 3,42 ^b	72,52
4	2,21; 2,16 (t)	2,16; 2,24 ^b	43,02
5	-	-	142,54
6	5,32 (dd)	5,35 (dd) ^a ; 5,32 ^b	122,33
7	1,59; 1,69 (q)	1,48; 1,57 ^b	34,52
8	1,61 (m)	1,58 ^b	30,85
9	0,98 (q)	0,90 ^b	51,53
10	-	-	36,57
11	1,57; 1,58 (m)	1,48; 1,51 ^b	22,14
12	1,78; 1,22 (q)	1,68; 1,10 ^b	41,07
13	-	-	40,45
14	1,17 (q)	1,02 ^b	57,87
15	1,32; 2,01 (q)	1,25; 1,95 ^b	33,30
16	4,34 (q)	4,38 (q) ^a ; 4,20 ^b	80,87
17	1,84 (t)	1,65 ^b	64,02
18	0,82 (s)	0,81 (s) ^a ; 0,75 ^b	16,97
19	1,02 (s)	1,03 (s) ^a ; 0,95 ^b	20,00
20	1,97 (m)	1,81 ^b	42,87
21	0,94 (d)	1,01 (d) ^a ; 0,88 ^b	15,52
22	-	-	98,25
23	1,65 (t)	1,56 ^b	32,93
24	1,30; 1,41(m)	1,35; 1,55 ^b	30,43
25	1,48 (m)	1,48 ^b	31,34
26	2,56; 2,65 (t)	2,68 (m) ^a ; 2,54; 2,58 ^b	48,00
27	0,85 (d)	0,86 (d) ^a ; 0,80 ^b	19,76

δ (ppm), s (singleto), t (triplete), d (dubeto), dd (duplo dubeto), q (quarteto), m (multipeto) ^a
 ZHAH et al, 2007, ^b PURI; WONG, 2003

O núcleo esteroidal dos compostos isolados possui quatro metilas. Estas estão ligadas aos carbonos 18, 19, 21 e 27. As metilas 18 e 19 estão ligadas a carbonos quaternários, ou seja, elas não apresentam hidrogênios vizinhos capazes de produzirem desdobramentos e são identificadas no espectro de RMN de hidrogênios por singletos, em δ 0,82 e δ 1,02, respectivamente. Porém, as metilas 21 e 27 estão ligadas a carbonos terciários possuindo um hidrogênio vizinho que desdobra em sinais de dubletos em δ 0,94 e δ 0,85 ppm, respectivamente.

Sabe-se que hidrogênio vizinhos à carbonos quirais são diastereotópicos, resultando em diferentes deslocamentos químicos no espectro de RMN de hidrogênios (PAVIA, LAMPAMAN, KRIZ, 2001). Este efeito foi observado nos hidrogênios ligados aos carbonos C-1, C-2, C-4, C-7, C-11, C-12, C-15, C-23, C-24 e C26.

Observando os deslocamentos encontrados, nota-se que o H-16 da SD, SS e SM, possui um maior deslocamento químico (δ 4,34), isto ocorre porque que o carbono encontra-se ligado a um oxigênio, heteroátomo mais eletronegativo que o carbono, resultando em maior desblindamento deste hidrogênio. O mesmo efeito também foi observado para o H-3 (δ 3,38). O H-16 apresenta-se no espectro de RMN- ^1H como um quarteto, pois possui três hidrogênios vizinhos, sendo dois ligados ao C-15 e um ao C-17. O H-3 apresenta-se como multipletto, devido ao acoplamento com os hidrogênios dos carbonos 2 e 4.

Em todos os compostos isolados observou-se para o H-6 o deslocamento químico de 5,32 ppm. Esse valor de deslocamento deve-se ao fato de que no C-6 haver uma ligação dupla com o C-5 ocasionando o efeito anisotrópico que aumenta a desblindamento e, conseqüentemente, o deslocamento químico.

Os alcalóides em questão são do tipo espirosolano, tendo um anel tetrahydrofurano e um anel piperidínico ligado em espiro, fornecendo perfil de RMN ^1H característico. O multipletto com deslocamento químico em campo baixo, δ 4,34 ppm corresponde ao hidrogênio metílico geminal (H-16).

Em relação às análises de HMQC, observou-se nos mapas de contorno que o deslocamento do C-22 foi maior que o C-26 nos três compostos, pois além destes carbonos estarem ligados ao nitrogênio, o C-22 liga-se também a um segundo heteroátomo (oxigênio), aumentando ainda mais seu desblindamento.

Os carbonos C-10, C-13 e C-22 são carbonos quaternários, não possuindo átomos de hidrogênio ligados a eles.

A ligação dupla presente entre os C-5 e C-6 foi identificada pelos altos valores de deslocamento nos mapas de contornos, δ 122,33 e δ 142,54 ppm respectivamente.

Na figura 18 ilustra-se o núcleo esteroidal dos heterosídeos alcaloídicos com suas correlações ^1H - ^{13}C e acoplamentos ^1H - ^1H .

Figura 18: Núcleo esteroidal e correlações observadas HMBC e acoplamentos observados em COSY.

Não foi possível discernir entre os sinais das cadeias de açúcares presentes na solasonina e solamargina no espectro de hidrogênio, uma vez que houve sobreposição desses. Pela expansão dos espectros de hidrogênio nas regiões de δ 3,4 a 4,6 ppm para a solsonina (Apêndice 7) e solamargina (Apêndice 12) observam-se sinais que não encontram-se no espectro de hidrogênio de solasodina (Apêndice 4). Porém, os sinais correspondentes ao núcleo esteroidal estão presentes nos três compostos isolados.

Com intuito de se observar diferenças entre os açúcares dos heretosídeos alcaloídicos, SS e SM, também foram obtidos os mapas de contorno de COSY (Apêndice 8 e 13) e de HMBC (Apêndice 9 e 14), respectivamente. No entanto, os dados fornecidos por essas análises não foram suficientes para a diferenciação das cadeias de açúcares correspondente a cada heterosídeo devido a sobreposição de sinais.

5.8 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do extrato alcaloídico e dos compostos isolados sobre células LLCMK₂

É interessante que as substâncias avaliadas sobre os parasitas não sejam tóxicas, pois desta maneira não causarão morte ou danos às células hospedeiras.

Na figura 19 (A e B) e na tabela 5 apresentam-se os resultados da citotoxicidade sobre as células LLCMK₂ e os valores do CI₅₀, respectivamente, do extrato alcaloídico e compostos isolados, após o período de 24 e 72 h.

O maior valor de CI₅₀ ocorreu para a aglicona, solasonina, podendo sugerir que alguma toxicidade pode estar relacionada a cadeia de açúcares ligada nos compostos isolados solasonina e solamargina, havendo influência na penetração das células, como ocorre em células tumorais (CHANG et al., 1998; CHAM, DAUTER, 1990; LI et al., 2007).

Figura 19: Curva dose-resposta para a atividade citotóxica do extrato alcaloídico e compostos isolados em 24h (gráfico A) e 72h (gráfico B). *EA (μg/mL)

Tabela 5: Valores de CI_{50} em 24 e 72 h do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre células LLCMK₂.

Substância	CI_{50} μM - 24h	CI_{50} μM - 72h
Extrato alcaloídico *	20,40	6,48
Solamargina	28,99	11,24
Solasonina	105,2	20,62
Solasodina	124,0	82,19
Mistura equimolar	29,44	10,05

* $\mu g/mL$

Avaliando-se o efeito do tempo de exposição das células aos compostos, observou-se que após 72h, o efeito tóxico foi maior comparado ao tempo de 24h.

A toxicidade da solasonina aumentou em 80,4% no ensaio após 72h de exposição às células (CI_{50} : 20,62).

O extrato alcaloídico apresentou os menores valores de CI_{50} em 24 e 72h (20,40 $\mu g/mL$ e 6,48 $\mu g/mL$, respectivamente). Tal fato pode ter ocorrido pelo extrato possuir outros compostos, além dos heterosídeos alcaloídicos, que contribuam para a toxicidade celular.

A solamargina apresentou maior toxicidade do que a solasonina nos dois períodos avaliados, demonstrando que pode haver influência do tipo de açúcares ligados em tal atividade.

A mistura equimolar dos dois heterosídeos alcaloídicos também apresentou citotoxicidade, porém com valores muito próximos aos de CI_{50} encontrados para a solamargina quando avaliada separadamente nos períodos de tempos analisados. Logo, a atividade citotóxica pode ser devido, principalmente, a presença desse composto na mistura, indicando que os dois heterosídeos alcaloídicos não atuaram sinergicamente na atividade avaliada.

5.9 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

A análise dos resultados obtidos neste ensaio (Figura 20 (A e B); e Tabela 6) demonstram que o extrato alcaloídico (CI_{50} : 6,62 $\mu g/mL$), solamargina (CI_{50} : 14,44 μM) e mistura equimolar (CI_{50} : 15,32 μM), apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* comparando-se com o valor encontrado para o controle positivo, anfotericina, CI_{50} (14,88 μM) em 24h.

Figura 20: Curva dose-resposta do extrato alcaloídico e compostos isolados para a atividade leishmanicida em 24h (gráfico A) e 72h (gráfico B). *EA (µg/mL).

Tabela 6: Valores de CI_{50} em 24 e 72 h do extrato alcaloídico e compostos isolados sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*

Substância	CI_{50} (µM) - 24h	CI_{50} (µM) - 72h
Extrato alcaloídico *	6,62	3,64
Solamargina	14,44	6,17
Solasonina	23,63	7,79
Solasodina	238,4	219,2
Mistura equimolar	15,32	1,11
Anfotericina	14,88	1,53

* (µg/mL)

A atividade leishmanicida da mistura equimolar, após 72h de exposição dos compostos, permitiu valores de CI_{50} (1,11 μM) menor que o do controle positivo (CI_{50} = 1,53 μM). Tal fato pode ser explicado pelo possível sinergismo ocorrido entre as substâncias isoladas para esta atividade depois de decorrido tal período. Porém, no período de 24h o valor de CI_{50} (15,32 μM) foi próximo ao valor encontrado para a solamargina (CI_{50} : 14,44 μM). Em um estudo realizado por Hall, Hobby e Cipollini (2006) sobre duas cepas de *T. cruzi* (também protozoários) demonstrou que a eficácia da solamargina, com suas duas ramnosos terminais, foi maior mesmo quando comparado o efeito dos dois compostos testados na proporção de 1:1.

Comparando-se os tempos de exposição, a solasonina demonstrou ser mais ativa contra leishmania no ensaio realizado após 72h. Porém, a solamargina, apresentou-se mais ativa do que a solasonina em ambos períodos avaliados. Resultados encontrados por Chataing et al. (1998) testando os mesmos heterosídeos alcaloídicos, extraídos de outra espécie do gênero *Solanum*, sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de duas diferentes cepas de *T. cruzi*, demonstraram que a solasonina requer maior concentração para induzir resultado similar ao da solamargina.

A aglicona solasodina apresentou valores de CI_{50} (238,4 μM e 219,2 μM , em 24 e 72 h, respectivamente) muito altos para a atividade avaliada. Isto pode ter ocorrido devido ao fato da maioria das moléculas de superfícies, no estágio promastigosta, das diferentes espécies de leishmanias, serem do tipo glicoproteína (MCCONVILLE, FERGUSON, 1993) necessitando, talvez, de algum tipo de açúcar, como ocorre nos compostos isolados, para ocorrência dessa atividade.

Delorenzi et al. (2001) e Ferreira et al. (2002) descrevem em seus trabalhos a ocorrência de atividade leishmanicida também para outras classes de alcalóides.

5.10 Atividade *in vitro* do extrato alcaloídico sobre *Strongyloides venezuelensis*

A mortalidade nas concentrações de 2,0 mg/mL e 1,0 mg/mL ocorreu em 100% e 67 % dos vermes, respectivamente após 72 h. Não houveram mortes nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL no período de observação (Figura 21).

Figura 21: Porcentagem de vermes mortos em relação as doses testadas: D1 (2,0mg/mL); D2 (1,0mg/mL); D3 (0,5mg/mL); D4 (0,25mg/mL). O grupo controle (C) não sofreu alterações.

Na tabela 7 encontram-se relacionadas a motilidade dos vermes nas diferentes doses e tempos de exposição.

Na concentração de 2,0 mg/mL os vermes apresentaram intensa motilidade (tabela 7) até o período de 24 h. Em 48 h 50 % dos vermes apresentaram pouca movimentação.

Tabela 7: Motilidade referente a 2 vermes para cada poço em diferentes concentrações do extrato alcalóidico

Concentrações	Motilidade dos vermes Tempo de observação (horas)									
	1-6	12	24	48	72					
controle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2,0 mg/mL	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
1,0 mg/mL	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	-
0,5 mg/mL	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,25 mg/mL	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+): baixa; (++) : moderada; (+++) : intensa; (-) : ausência de movimentação

Na concentração de 1,0 mg/mL a movimentação dos parasitas se manteve intensa até 48 h. Em 72 h, 33% dos vermes ainda apresentavam algum movimento e 67% estavam sem movimentação.

A movimentação dos vermes nas concentrações de 0,5 mg/mL 0,25 mg/mL e grupo controle foi intensa durante todo o período de observação.

Observou-se a presença de ovos para todas as concentrações, assim como no grupo controle.

O *S. venezuelensis* é um nematóide, assim como o *Dioctophyna renale* que pode causar parasitose renal nos lobos. Em tal ensaio realizado esperava-se uma alta atividade do extrato alcaloídico contra *S. venezuelensis* uma vez que esse parasita pertence à mesma classe do *D. renale*. Todavia, esse ensaio corresponde ao screening inicial e as substâncias isoladas devem ser avaliadas separadamente e em conjunto avaliando-se todos os parâmetros do protocolo.

A atividade de heterosídeos alcaloídicos contra nematóides fitoparasitas, ressaltando a importância da ramnose na toxicidade, foi confirmada em estudo realizado por Udalova et al. (2004). Outros trabalhos também demonstram a atividade de alcalóides do tipo isoquinolínicos (SATO et al., 2002) e de extratos de diferentes espécies da família Solanaceae contra nematóides (HASEEB, BUTOOL, 1996).

5.11 Avaliação *in vitro* da atividade do extrato alcaloídico e compostos isolados em vermes adultos e no desenvolvimento de ovos de *Schistosoma mansoni*

Como apresentado na tabela 8, após 24 h de incubação, 100 % dos casais de vermes adultos foram separados (macho e fêmea) e mortos na presença do extrato alcaloídico (50, 32 e 20 µg/mL), solamargina (32 e 50 µM), solasonina (50µM) e mistura equimolar (20, 32 e 50 µM). Além disso, observou-se também alteração significativa no tegumento destes vermes o qual não foi observado no controle negativo (Figura 22).

Os resultados de 120 h que não estão apresentados na tabela 8 foram iguais aos observados em 24 h para as diferentes concentrações das substâncias testadas.

Tabela 8: Efeito *in vitro* do extrato alcalóidico e compostos isolados dos frutos de *S. lycocarpum* em vermes adultos de *S. mansoni*

Substância	concentração (μ M/mL)	Período de incubação	% de casais separados	% de vermes mortos	% Redução da atividade motora		N° de vermes com tegumento alterado	
					Baixa	significante	parcial	extensivo
controle*		24h	0	0	0	0	0	0
0,1% DMSO		24h	0	0	0	0	0	0
PZQ**	10	24h	0	100	0	100	25	75
Extrato***	50; 32; 20	24h	100	10	0	100	0	100
	8; 0,5	24h	0	0	0	0	0	0
Solasonina	50	24h	100	100	0	100	0	100
	32	24h	0	0	0	0	0	0
		120h	0	0	0	100	0	0
	20; 8; 0,5	24h	0	0	0	0	0	0
Solamargina	50;32	24h	100	100	0	100	0	100
	20	24h	50	25	0	100	0	100
	8; 0,5	24h	0	0	0	0	0	0
Mistura equimolar	50;32;20	24h	100	100	0	100	0	100
	8; 0,5	24h	0	0	0	0	0	0
Solasodima	50	24h	0	0	0	0	0	0

* RPMI 1640

** Praziquantel

*** μ g/mL

Figura 22: Alterações no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* após 24 h de exposição as drogas. Controle negativo: parasitas em meio RPMI 1640 e meio RPMI com 0,1% de DMSO.

A solasonina (32 μ M) após 120 h de incubação produziu redução na atividade motora em todos os vermes expostos a essa concentração.

Após incubação por 24 h, com solamargina (20 μ M), 50 % dos vermes adultos foram separados e 25 % dos vermes morreram. Os outros vermes que permaneceram vivos, nessa concentração, apresentaram redução na atividade motora e alterações significativas no tegumento.

A atividade biológica dos glicoalcalóides derivados de diferentes espécies do gênero *Solanum* pode ocorrer, segundo Roddick, Weissenberg e Leonard (2001), principalmente por duas propriedades: a) habilidade de complexar com a membrana interrompendo sua integridade e função, e b) inibição da acetilcolinesterase (uma importante enzima para transmissão do impulso nervoso). Com relação a interrupção da integridade e função da membrana, glicoalcalóides contendo açúcar do tipo chacotriose (ramnose-glicose-ramnose), como ocorre na solamargina, são normalmente mais ativos que compostos que contêm açúcar do tipo solatriose (ramnose-galactose-glicose), como ocorre na solasonina. Já para a atividade de inibição da acetilcolinesterase, os glicoalcalóides parecem atuar igualmente, não ocorrendo sinergismo (RODDICK, RIJNENBERG, 1987). Talvez alguma dessas propriedades ou a combinação de ambas possa ser a forma de ação das substâncias testadas sobre os vermes adultos de *S.mansoni*.

A mistura equimolar na concentração de 20 μ M demonstrou ser mais ativa do que a solamargina, quando analisada nesta mesma concentração, separadamente. Heterosídeos alcaloídicos estão frequentemente associados em diferentes espécies do gênero *Solanum* e, possivelmente, pode existir sinergismo entre os diferentes tipos de glicoalcalóides sobre condições naturais (RODDICK, RIJNENBERG, 1987).

A mistura de solasonina e solamargina também demonstrou sinergismo na citotoxicidade em células tumorais (CHAM, DAUNTER, 1990). Efeitos similares foram descritos em alguns protistas e em estudos de avaliação antifúngica (FEWELL, RODDICK, WEISSENBERG, 1994; CHAM, 2007).

Estudos mostram que o *Schistosoma* é incapaz de sintetizar hormônios esteróides (MENDONÇA et al., 2000), porém Briggs (1972) demonstra que tais vermes podem converter uma variedade de esteróides e esses podem afetar a produção de ovos pelo parasita. Estudos realizados com ratos tratados com andrógeno ou estrógeno mostraram reduzir a carga parasitária nesses animais. (BUSSOLATI et al., 1976; BARRABES et al., 1980). Os compostos isolados

testados neste estudo apresentam núcleo parecido com hormônios, entretanto, em nenhuma das concentrações testadas do extrato alcaloídico e compostos isolados houve redução significativa do número de ovos produzidos pelos vermes que permaneceram vivos comparando-se com o número de ovos presentes no controle negativo (meio RPMI 1640 e meio com 0,1% de DMSO) (dados não mostrados).

A aglicona, solasodina (50 μ M), não apresentou atividade, mesmo após 120h de incubação, contra os vermes adultos na concentração testada, permanecendo todos os casais acoplados, sem alterações no tegumento e motilidade. Por este motivo, não foram avaliadas concentrações menores para este composto.

O praziquantel (10 μ M), controle positivo, após 24 h, causou a morte dos parasitas e alteração do tegumento sem separação dos vermes. No entanto, tanto o extrato alcaloídico, quanto os glicoalcalóides foram capazes de promover a separação dos casais. Em relação ao controle negativo e 0,1 % de DMSO, não foram observados alterações no tegumento e na atividade motora dos vermes.

Não há relatos na literatura da atividade do extrato dos frutos de *S. lycocarpum* e seus compostos isolados contra *S. mansoni*, porém a atividade moluscicida (contra *B. glabrata*) da solamargina isolada da espécie *Solanum sisymbriifolium* foi testada demonstrando atividade contra esse molusco (Bagalwa, et al., 2010). Outros trabalhos também descrevem atividade moluscicida para diferentes glicoalcalóides demonstrando uma maior efetividade da solamargina (WANYONYI et al., 2002; SILVA et al., 2008).

Outros alcalóides também têm sido estudados quanto a atividade antiparasitária frente à *S. mansoni*. BOGITSH (1977) observou o efeito *in vitro* da colchicina e vimblastina sobre esquistossômulos. Moraes et al. (2010) observou a atividade do alcalóide piplartina sobre vermes adultos.

Para analisar o desenvolvimento dos ovos, casais de vermes adultos de *S. mansoni* foram incubados por 48 h, e após esse período, os parasitas foram removidos do meio de cultura contendo os ovos. As substâncias testadas foram adicionadas em diferentes concentrações. Como descrito por Michaels e Prata (1968), aproximadamente 20-30% dos ovos liberados pelos parasitas adultos, nos primeiros dois dias de cultura *in vitro*, desenvolvem-se, passando por seis estágios em 5 dias até a formação do miracídio em seu interior (Figura 23).

Figura 23: Estágios de desenvolvimento dos ovos
 Fonte: MAGALHÃES, 2009

Quando os ovos foram incubados com extrato alcaloídico (10 e 15 $\mu\text{g/mL}$), solamargina (10, 15 e 20 μM), solasonina (50 μM) e mistura equimolar (10 e 15 μM) observou-se uma diminuição significativa (Figura 24) na porcentagem de ovos desenvolvidos quando comparado com os controles negativos, sendo que o desenvolvimento da maioria dos ovos incubados na presença destas substâncias foram inibidos nos estágios iniciais de desenvolvimento (Figura 25).

Figura 24: Análise quantitativa do desenvolvimento dos ovos, após 120 h de incubação.
 * diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo controle negativo

Figura 25: Ilustração do desenvolvimento dos ovos incubados em meio RPMI (A) e com as substâncias testadas (B).

5.12 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo* do extrato alcaloídico

Neste experimento realizou-se diferentes tempos de tratamento para que todas as fases do ciclo do parasita (*S. mansoni*) fossem avaliadas *in vivo* frente a diferentes concentrações do extrato alcaloídico.

Para todos os tratamentos, o extrato alcaloídico foi administrado diariamente por 5 dias consecutivos por via oral. Cada subgrupo (n=5) recebeu no final dos tratamentos as seguintes concentrações do extrato alcaloídico: 50 mg/Kg (subgrupos: A1, B1, C1 e D1), 100 mg/Kg (subgrupos: A2, B2, C2 e D2) e 200mg/Kg (subgrupos: A3, B3, C3 e D3). Todos os animais foram mortos após 55° dias de infecção.

Tais concentrações foram utilizadas neste trabalho devido a realização de ensaios prévios de DL_{50} em camundongos não infectados (dados não mostrados). Concentrações superiores a utilizadas provocaram a morte de alguns animais.

Após o sacrifício dos animais tratados e grupos controles deste trabalho, o número de vermes adultos (machos, fêmeas e casais) recuperados por perfusão do sistema porta hepático foram determinados. A figura 26 e tabela 9 mostram que o número total de vermes recuperados não apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) quando comparados com o controle negativo. Tal fato pode ser explicado em parte devido a técnica empregada para a recuperação dos vermes (perfusão) ser de difícil realização, podendo haver perda desses na cavidade abdominal uma vez que, os ensaios *in vitro* confirmaram ação do extrato alcaloídico contra vermes adultos de *S. mansoni*. Há de se destacar também que a biodisponibilidade (absorção) desses alcalóides pode ser dificultada, quando administrado oralmente, por se tratarem de substâncias com unidades de açúcares. Outro aspecto a ser considerado é a metabolização desses alcalóides pela microbiota intestinal dos animais, diminuindo também a biodisponibilidade desses, ocasionando baixa concentração nos vermes. Assim, outras vias de administração devem ser testadas, tais como: intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, bem como o desenvolvimento de formulações farmacêuticas que possibilitem o aumento da biodisponibilidade por via oral.

Tabela 9: Média $\pm$ desvio padrão dos vermes recuperados na perfusão

Grupos	Concentrações (mg/Kg)	Número de casais	Número de machos	Número de fêmeas	Total de vermes
A	50	3,40 $\pm$ 2,19	14,40 $\pm$ 3,21	0,80 $\pm$ 1,30	22 $\pm$ 6,82
	100	3,6 $\pm$ 4,72	14,2 $\pm$ 9,88	1,2 $\pm$ 1,30	22,6 $\pm$ 6,51
	200	3,8 $\pm$ 4,32	14,4 $\pm$ 5,49	0,4 $\pm$ 0,55	22,4 $\pm$ 7,00
B	50	4,2 $\pm$ 1,92	15,6 $\pm$ 2,61	2 $\pm$ 2,34	26 $\pm$ 7,84
	100	3,8 $\pm$ 2,77	16,0 $\pm$ 6,0	1,0 $\pm$ 0,45	24,6 $\pm$ 7,52
	200	4,4 $\pm$ 9,3	9,6 $\pm$ 3,21	0,4 $\pm$ 0,55	18,8 $\pm$ 5,10
C	50	3 $\pm$ 2,12	11,2 $\pm$ 5,26	0,8 $\pm$ 1,30	18 $\pm$ 5,20
	100	0,8 $\pm$ 0,84	11,2 $\pm$ 9,31	1,4 $\pm$ 1,67	14,2 $\pm$ 5,60
	200	2,6 $\pm$ 0,89	14,6 $\pm$ 7,83	0,8 $\pm$ 0,83	20,6 $\pm$ 7,05
D	50	3,6 $\pm$ 1,30	13,6 $\pm$ 3,57	0	20,8 $\pm$ 6,80
	100	3,1 $\pm$ 2,79	13 $\pm$ 5,09	0,2 $\pm$ 0,45	19,4 $\pm$ 6,40
	200	4 $\pm$ 4,14	14,6 $\pm$ 9,20	0,4 $\pm$ 0,55	22,4 $\pm$ 7,11
CN *		4,2 $\pm$ 4,44	10,8 $\pm$ 8,14	0,2 $\pm$ 0,45	19,4 $\pm$ 5,56
PZQ**	300	3,2 $\pm$ 1,79	12,2 $\pm$ 4,69	0	18,6 $\pm$ 6,10

* CN: controle negativo

** PZQ: praziquantel

A:

Figura 26: Carga parasitária total após tratamento dos camundongos com extrato alcaloídico e controles infectados com *S. mansoni*. Os pontos representam os dados individuais dos animais ($n=5$) e as barras horizontais representam a média da carga parasitária em cada tratamento. ($P<0,05$). Grupo A: tratados um dia após infecção; Grupo B: tratados vinte e três dias após infecção; Grupo C: tratados trinta e sete dias após infecção; Grupo D: tratados quarenta e cinco dias após infecção.

Os fígados e baços de todos os camundongos foram coletados e pesados. Pela tabela 10, podemos observar que apenas os subgrupos A1, A2, C2 e D2 não apresentaram hepatoesplenomegalia, uma vez que os tamanhos de seus fígados não foram estatisticamente diferentes ($P<0,05$) do grupo de animais não infectados.

Já os baços de todos os animais apresentaram-se aumentados em comparação aos animais não infectados (Tabela 10).

Tabela 10: Pesos médios $\pm$ desvio padrão da média dos fígados e baços dos animais tratados, controles e sem infecção.

Grupos	Concentrações (mg/Kg)	Peso dos fígados (g) Média $\pm$ DP	Peso dos baços (g) Média $\pm$ DP
A	50	0,059 $\pm$ 0,009* #	0,012 $\pm$ 0,003 ∞
	100	0,061 $\pm$ 0,007* #	0,014 $\pm$ 0,003 ∞
	200	0,070 $\pm$ 0,018 &	0,015 $\pm$ 0,004 ∞
B	50	0,071 $\pm$ 0,006 # &	0,013 $\pm$ 0,002 ∞
	100	0,073 $\pm$ 0,014 &	0,015 $\pm$ 0,004 ∞
	200	0,069 $\pm$ 0,099 # &	0,015 $\pm$ 0,002 ∞
C	50	0,077 $\pm$ 0,021 &	0,014 $\pm$ 0,002 ∞
	100	0,067 $\pm$ 0,007	0,011 $\pm$ 0,003 ∞
	200	0,078 $\pm$ 0,017 &	0,015 $\pm$ 0,004 ∞
D	50	0,071 $\pm$ 0,012 # &	0,015 $\pm$ 0,002 ∞
	100	0,0621 $\pm$ 0,007 * #	0,012 $\pm$ 0,002 ∞
	200	0,071 $\pm$ 0,007 # &	0,013 $\pm$ 0,002 ∞
Controle (CN)		0,082 $\pm$ 0,011* &	0,017 $\pm$ 0,004 ∞
PZQ	300	0,089 $\pm$ 0,007# &	0,016 $\pm$ 0,004 ∞
Sem infecção		0,049 $\pm$ 0,003 &	0,004 $\pm$ 0,000 ∞

* diferença estatística do peso dos fígados com o controle negativo

diferença estatística do peso dos fígados com o controle positivo: praziquantel

& diferença estatística do peso dos fígados com o grupo sem infecção

∞ diferença estatística do peso dos baços com o grupo sem infecção

P<0,05.

Observou-se redução do número de ovos no fígado dos animais tratados com diferentes concentrações do extrato alcaloídico (Figura 27). Apenas os subgrupos C3 (200 mg/Kg) e D1 (50 mg/Kg) não apresentaram diferença estatística com relação ao controle negativo.

Figura 27: Número de ovos /mg de fígados dos animais.

* diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) com relação ao grupo controle negativo
 Grupo A: tratados um dia após infecção; Grupo B: tratados vinte e três dias após infecção;
 Grupo C: tratados trinta e sete dias após infecção; Grupo D: tratados quarenta e cinco dias após infecção.

A redução de ovos em grama de fígado foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Wang et al. (2008). O grupo que apresentou maior redução no número de ovos foi o A (Tabela 11).

Tabela 91: Porcentagem de redução de ovos.

Concentrações	RO%			
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
50 mg/kg	73,61	27,90	23,97	22,62
100 mg/kg	76,11	54,82	71,18	49,24
200 mg/kg	66,76	34,11	20,89	28,11
PZQ - 300mg/kg				69,37

Os subgrupos A1, A2, A3 e C2 apresentaram redução do número de ovos maior que 66%. Pode-se observar que para o extrato alcaloídico administrado na concentração de 100 mg/Kg os valores de porcentagem de redução dos ovos apresentaram-se maiores do que as outras concentrações testadas dentro do mesmo grupo. Possivelmente essa concentração deve ter sido a mais ativa neste ensaio realizado, podendo concentrações maiores apresentar alguma toxicidade para o animal e concentrações menores não atingir dosagens efetivas.

O número de granulomas presentes no fígado (Figura 28) foi mais baixo em todos os animais tratados em relação aos animais do grupo controle negativo.

Figura 28: Média do número de granulomas/ fígado contando-se 20 campos de 6,4mm²

* grupos com diferença estatística com relação ao controle negativo (P<0,05).

Grupo A: tratados um dia após infecção; Grupo B: tratados vinte e três dias após infecção; Grupo C: tratados trinta e sete dias após infecção; Grupo D: tratados quarenta e cinco dias após infecção.

A área dos granulomas também foi determinada (Figura 29). Porém, não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre o tamanho dos granulomas dos diferentes grupos tratados comparando-se com o controle negativo.

Figura 29: Média da área dos granulomas dos grupos tratados e controle. Grupo A: tratados um dia após infecção; Grupo B: tratados vinte e três dias após infecção; Grupo C: tratados trinta e sete dias após infecção; Grupo D: tratados quarenta e cinco dias após infecção.

Diante dos resultados encontrados pode-se concluir que o extrato alcaloídico possui atividade *in vivo* contra *S. mansoni*. Nas fases iniciais do ciclo do parasita, o extrato alcaloídico, pode ter atuado no desenvolvimento dos vermes impedindo seu crescimento e posteriormente a ovoposição. Nas fases posteriores avaliadas, que também ocorreram redução do número de ovos e granulomas, a ação do extrato alcaloídico pode ter sido devido ao impedimento do acasalamento dos vermes ou, nas últimas fases, pela separação dos casais de vermes adultos. Esta última hipótese é corroborada pelos resultados encontrados nos ensaios *in vitro* onde

diferentes concentrações do extrato alcaloídico testadas permitiu a separação dos casais.

A concentração de extrato alcaloídico que mostrou ser mais eficaz foi a de 100 mg/Kg para todos os grupos tratados.

A redução no número de granulomas (principal patologia causada pela doença) em todos os grupos tratados demonstra que o extrato alcaloídico pode ser promissor no tratamento da esquistossomose em qualquer fase do ciclo do parasita no hospedeiro definitivo.

Ressalta-se que apesar do tamanho dos granulomas não apresentarem diferença estatística significativa com relação ao grupo controle negativo, em muitas lâminas dos grupos tratados foi difícil encontrar granulomas com as características previamente estabelecidas para a determinação de sua área devido a baixa ocorrência.

6. CONCLUSÕES

A extração ácido/base dos frutos de *S. lycocarpum* demonstrou-se seletiva para os compostos de interesse.

O isolamento dos heterosídeos alcaloídicos, solamargina e solasonina, pode ser realizado por cromatografia *flash*, seguida de repurificação em CLAE preparativo e por CCDP.

A melhor fase móvel para avaliação em CCDC do extrato alcaloídico e frações foi AcOEt : MeOH : H₂O : NH₄OH (63 : 40 : 2 : 0,3).

A aglicona, solasodina, pode ser obtida por hidrólise ácida seguida de partição e fracionamento em coluna clássica.

Para análise em CLAE, o método analítico desenvolvido foi eficiente para análise do extrato alcaloídico e dos heterosídeos alcaloídicos.

Os espectros de massas obtidos e os dados de RMN confirmam a identidade dos compostos de interesse isolados.

O ensaio antiparasitário *in vitro* contra leishmaniose demonstrou que o extrato alcaloídico, solamargina e a mistura equimolar dos heterosídeos alcaloídicos possuem atividade leishmanicida em 24 h e 72 h.

O extrato alcaloídico na concentração de 2,0 mg/mL (após 48 h de incubação) demonstrou atividade contra *S. venezuelensis*.

A atividade esquistossomicida frente a vermes adultos de *S. mansoni* do extrato alcaloídico, solamargina, solasonina e da mistura equimolar provocou morte, alteração do tegumento e da atividade motora desses parasitas.

O extrato alcaloídico, solamargina e mistura equimolar demonstraram inibir o desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* em estágios iniciais.

A atividade *in vivo* contra *S. mansoni* demonstrou que o extrato alcaloídico pode atuar em diferentes fases do ciclo do parasita reduzindo o número de ovos e, conseqüentemente, de granulomas no fígado.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, P.; RELVA, A.; MATTHEW, S.; GOMES, Z.; MORAIS, Z. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated, and organic crop systems. **Food Control**, v.18, n. 1, p. 40-44, 2007.

AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R.B.; MARINHO-FILHO, J.A. Diversidade biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 1, p. 17-40, 2004.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-679, 2006.

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do Cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap. 22, p. 369-381, 2005.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA). 1994.

ARAGON, A.D.; IMANI, R.A.; BLACKBURN, V.R.; CUPIT, P.M.; MELMAN, S.D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E.S.; CUNNINGHAM, C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 164, p. 57-65, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed., Washington: Arlington, 1995.

BAGALWA, J.J.M.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; SAYAGH, C.; BASHWIRA, A.S. Evaluation of the biological activity of the molluscicidal fraction of *Solanum sisymbriifolium* against non target organisms. **Fitoterapia**, *Article in press*, 2010.

BALANÃ-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BARRABES, A.; DUONG, T.H.; REYNOUARD, F.; COMBESCOT, C. Experimental *Schistosoma mansoni* parasitosis in golden hamsters. Effects on the intensity of parasitism, and on the rate of antibodies' circulation, after administration of estrogen, testosterone, or progesterone. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 55, n. 6, 671-677, 1980.

BELENTANI, S.C.S. **Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae) no Parque Florestal Salto e Ponte, município de Prata, MG.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia. 2001. 71p.

BLANKEMEYER, J.T.; McWILLIAMS, M.L.; RAYBUM, J.R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chemistry Toxicology**, v. 36, p. 383-389, 1998.

BOGITSH, B.J. *Schistosoma mansoni*: Colchicine and vinblastine effects on schistosomule digestive tract development *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v.43, n. 1, p. 180-188, 1977.

BRIANI, D.C.; GUIMARÃES JUNIOR, P. Predação das sementes e frutos de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) danos em roedores, no Cerrado do Brasil Central. **Acta oecologica**, v.31, p. 8-12, 2007.

BRIGGS, M.H. Metabolism of steroid hormones by schistosomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 280, p. 481-485, 1972.

BUSSOLATI, C.; CARNERI, I.; CASTELLINO, S.; MARINONI, V.; SPERZANI, G.L. Treatment of experimental and clinical schistosomiasis with hormonal inhibitors of ovulation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 16, n. 4, p. 497-499, 1967.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, J.M. **O eterno plantio: um reencontro com a natureza.** São Paulo: Pensamento, 1994. 250 p.

CAMUSET, G.; RENY, V.; HANSMANN, Y.; CHRISTMANN, D.; GOMES DE ALBUQUERQUE, C.; SENA, G.A. Mucocutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazonia. **Medical Malpractice Infection**, v. 37, p. 343-346, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/submenus/sub_leishmania.htm>. Acesso em: 13 de out. 2009.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Strongyloidiasis.htm>>. Acesso em: 07 de set. 2010.

CHAM, B.E. Solasodine rhamnosyl glycosides specifically bind câncer cell receptors and induce apoptosis and necrosis. Treatment for skin cancer and hope for internal cancer. **Research Journal of Biological Science**, v. 2, p. 503-514, 2007.

CHAM, B. E.; DAUNTER, B. Solasodine glycosides: Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition by rhamnose in mice with sarcoma 180. **Cancer Letters**, v. 55, p. 221-225, 1990.

CHANG, C.V.; FELICIO, A.C.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 265-269, 2002.

CHANG, L.; TSAI, T.WANG, J.; LIN, C.; KUO, K. The rhamnose moiety of solamargina plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 242, n. 1, p. 21-25, 1998.

CHATAING, B.; CONCEPCION, J.L.; LOBATON, R.; USUBILLAGA, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by *Solanum* alkaloids. A comparison with ketoconazole. **Planta Medica**, v. 64, p. 31-36, 1998.

CHEEVER, A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bull World Health Organ**. V. 39, n. 2, p. 328-331, 1968.

COURTENAY, O. Conservation of the Maned Wolf: fruitful relationships in a changing environment. **Canid News**, v. 2, p. 41-42, 1994.

CRABBE, P.G.; FRYER, C. Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodina glycosides and soladiene by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 187, p. 87-100, 1980.

CRUZ, G.L. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira 1985. 360p.

DALL' AGNOL, R.D.; VON POSER, G.L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 337-341, 2000.

DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M.B. Antileishmanial activity of indol alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1349-1354, 2001.

DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 392, p. 1-51, 1984.

DISTIL, M.; WINK, M. Identification and quantification of steroidal alkaloids from wild tuber-bearing *Solanum* species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Research**, v. 104, p. 52-79, 2009.

DUNNE, D.W.; PEARCE, E. J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 553-560, 1999.

EANES, R.C.; TEK, N.; KIRSOY, O.; FRARY, A.; DOGONLAR, S.; ALMEIDA, A.E. Development of practical HPLC methods for separation and determination of eggplant steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**, v. 31, p. 984-1000, 2008.

EDWARDS, E.J.; COBB, A.H. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Potato (*Solanum tuberosum*) Glycoalkaloids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2705-2709, 1996.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 35-36, 2003.

ELTAYEB, J.T.; BLANKEMEYER, M.L.; MCWILLIAMS, J.R.; RAYBURN, M.; WEISSENBERG, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chemistry Toxicology**, v. 36, p. 383- 389, 1998.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 5ªed, cap.12, p. 263-288, 2004.

FERGUSON, M.A.J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical transactions of the Royal Society of London Biology Science**, v. 352, p. 1295-1302, 1997.

FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 80, p. 199-202, 2002.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu. 2006. 532p.

FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M. Interactions between the glycoalkaloids solasonine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1007-1011, 1994.

FRIEDMAN, M.; MCDONALD, G. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 55–132, 1997.

GENTA, R.M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Reviews of infectious diseases**, v. 1, p. 755-67, 1989.

GOBBO-NETO; L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOSWANI, A.; KOTOKY, R.; RASTOGI, R.C.; GHOSH, A.C. A one-pot efficient process for 16-dehydropregnenolone acetate. **Organic Process Research and Development**, v. 7, p. 306-308, 2003.

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

HACKETT F. The cultures of *Schistosoma mansoni* and production of life cycle stages. **Methods Molecular Biology**, v. 21, p. 89-99, 1993.

HALL, C.A.; HOBBY, T.; CIPOLLINI, M. Efficacy and Mechanisms of α -Solasonine and α -Solamargine-Induced Cytolysis on Two Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Chemistry and Ecology**, v. 32, p. 2405–2416, 2006.

HARAGUCHI, M.; UCHIMURA, R.T.; MOTIDOME, M.; GOTTLIEB, O. Aproveitamento dos esteróides dos frutos da lobeira. **Ciência e cultura**, v. 32, p. 81-82, 1978.

HART, B.L. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v. 14, p. 273-294, 1990.

HASEEB, A.; BUTOOL, F. Evaluation of nematicidal properties of some members of the family Solanaceae. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 95-97, 1996.

HELMY, M.M.F.; MAHMOUD, S.S.; FAHMY, Z.H. *Schistosoma mansoni*: effect of dietary zinc supplement on egg granuloma in swiss mice treated with praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 310–317, 2009.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 5ª ed, cap.12, p. 13-25. 2004.

HURST, M.H.; LOLA, S.G.; LINDBERG, R. Immunomodulation of the hepatic egg granuloma in *Schistosoma japonicum* -infected pigs. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 681-686, 2006.

HURST, M.H.; WILLINGHAM III, A.L.; LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low- or high-dose infections. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 45-56, 2000.

INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP. Espectrometria de massas. Disponível em <<http://em.iqm.unicamp.br/>>. Acesso em abril de 2009.

JADHAV, S.J.; SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. **Toxicology**, v. 9, p. 21-104, 1981.

JOHNSTON, D.A. Opening the can of worms: molecular analysis of *Schistosoma* population. **Parasitology Today**, v. 9, p. 286-291, 1993.

KALIFE, J.; CÊTRE, C.; PIERROT, C.; CAPRON, M. Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. **Parasitology International**, v. 49, p. 339-345, 2000.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffii* thii. **Phytochemistry**, v. 50, p. 75-79, 1999.

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. **Neglected Tropical Diseases**, v. 3 p. 1-11, 2009.

KNOBLOCH, J.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. **Journal Parasitology**, v. 36, n 12, p. 1261-1272, 2006.

KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C.; LIN, C.; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of Solanum glycoalkaloid solamargina: triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1865-1873, 2000.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The leishmaniasis in biology an medicine**, v. 1, p. 20-23, 1987.

LI, S.; HE, D.; ZHANG, X.; NI, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, L. Modification of sugar chains in glycoalkaloids and variation of anticancer activity. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 23, n. 3, p. 303-309, 2007.

LIMA, J.E. F.W.; SILVA, E.M. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FÉLFILI, J.M. **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap. 2, p. 63-72, 2005.

LOMBARDI, J.A.; MOTTA JUNIOR, J.C. Seed Dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 126-127, 1993.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 2ª ed. 1992. 382p.

MAGALHÃES, L.G. Via **Notch em Schistosoma mansoni: Aspectos moleculares e funcionais**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. 2009. 195p.

MAGALHÃES, L.G.; MACHADO, C.B.; MORAIS, E.R.; MOREIRA, E.B.; SOARES, C.S.; DA SILVA, S.H.; DA SILVA FILHO, A.A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009.

MALAGENO, E.; SANTANA, J.V. In: MALTA, J.A. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Editora Universitária/ UFPE, cap 2, p. 26-40, 1994.

MARUO, V.M.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 48-52, 2003.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 2ª ed. 1997. 128p.

MCCONVILLE, M.J.; FERGUSON, M.A.J. The structure, biosynthesis and function of glycosyl-phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher-eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 294, p. 305-324, 1993.

MENDONÇA, R.L; ESCRIVÁ, H.; BOUTON, D.; LAUDET, V.; PIERCE, R.J. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. **Parasitology Today**, v. 16, n. 6, p. 233-240, 2000.

MICHAELS, R.M.; PRATA, A. Evolution and characteristics of *Schistosoma mansoni* eggs laid *in vitro*. **Journal Parasitology**, v. 54, n 5, p. 921-930, 1968.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília-DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf>. Acesso em: 08 de jun. 2009.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.M.V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, Article in press, 2010.

MOTIDOME, M.; LEEKNING, M.; GOTTLIEB, O.R. A presença de solamargina no juá e na lobeira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências: A química de solanáceas brasileiras**, v. 42, p. 375-376, 1970.

MOTA JUNIOR, J.C.; MARTINS, K. The frugivorous diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in Brazil: ecology and conservation. In: LEVEY DJ, SILVA WR, GALETTI M, eds. **Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation**. Wallingford, UK: CAB Publishing, p. 291-303, 2002.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, “fruta-do-lobo” (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v.69, p. 1565-1572, 2008.

NAKAMURA; C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11ªed. São Paulo: Atheneu. 2005. 494p.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 412 p.

OLIVEIRA, A.N.; CIOCHETI, G.; PIVELLO, V.R. Ecologia trófica de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) em duas unidades de conservação no nordeste do estado de São Paulo. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu – MG. 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, J. Z. L. Análise nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. **Ciências Agrotécnica**, v. 27, p. 846-851, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=1232&Itemid=259> Acessado em 11 out. 2009.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3.ed. Washington. Thompson Learning, 2001. 680p.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PIO CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 6ªed. 1984. 327p.

POTT, A., POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. EMBRAPA. 1994. 320 p.

PURI, R.; WONG, T. C. ^1H and ^{13}C nmr assignments and structural determination of a novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural products**. v. 57, n.5, p.587-96, 1994.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-553, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZI, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-596, 2007.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2^a ed. 2002. 410p.

RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 1475–1477, 1995.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535, 2005.

RODDICK, J.G.; RIJNENBERG, A.L. Synergistic interaction between the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chalconine in relation to lysis of phospholipids/sterol liposomes. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1325–1328, 1987.

RODDICK, J.G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2631–2634, 1989.

RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M.; LEONARD, A.L. Membranedisruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. **Phytochemistry**, v. 56, p. 603–610, 2001.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis*: infections in mice. **International Journal Parasitology**, v. 20, p. 57–62, 1990.

SATOU, T.; KOGA, M.; MATSUHASHI, R.; KOIKE, K.; TADA, I.; NIKAIDO, T. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 131–138, 2002.

SAYED, A.A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C.P.; WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2008.

SCHWARZ, A.; PINTO, E.; HARAGUCHI, M.; OLIVEIRA, C.A.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1025–1028, 2007.

SCHWARZ, A.; SOARES, M.R.; FLÓRIO, J.C.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in utero and during lactation: Neurochemical, behavioral and histopathological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 861–870, 2005.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC-50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, C.A.; OLIVEIRA, K.F.; CARVALHO, V.C.O.; DOMIGUES, A.L.C. Efeito de tratamento cirúrgico sobre a atividade da enzima hepática lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) na esquistossomose mansônica. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 28-30, 2002.

SILVA, J.A.; SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil. 1994. 166p.

SILVA, J.M.C.; BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v. 53, n 3, p. 225-233, 2002.

SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; RODRIGUES, V.; PEREIRA JÚNIOR, O.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; SILVA, R.; BASTOS, J.K. Obtenção e atividade contra *Shistosoma* e nematóides, de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas, tetraidrofurânicas, furofurânicas, dibenzociclooctânicas e ariltetralínicas isoladas de fontes naturais e obtidas por síntese total ou parcial. **PI 0503951-7/Processo FAPESP 04/08784-1**. 2004.

SILVA, T.M.S.; CÂMARA, C.A.; FREIRE, K.R.L.; SILVA, T.G.; AGRA, M.F.; BHATTACHARYYAC, J. Steroidal glycoalkaloids and molluscicidal activity of *Solanum asperum* rich. Fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1048-1052, 2008.

SILVA, W.R. **Biologia e conservação do lobo-guará na estação ecológica de águas emendadas, DF**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Ecologia. 2002. 105p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007. 490 p.

SIMÕES, C.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2007. 1102p.

SMITHERS, S.R., TERRY, R.J. Infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*: and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695-700, 1965.

SOBIOLOGIA: Portal de Biologia e Ciências. Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/figuras/Reinos2/esquistossoma10.jpg>>. Acesso em: 13 de out. 2009.

SOUZA, A.E.; SILVA, T.M.S.; ALVES, C.C.F.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Erlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n 6, p. 838-842, 2002.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2ª ed. 2008. 640p.

STAHL, E.; BOLLINGER, H.R. **Thin-layer chromatography: a laboratory handbook**. Ed. Springer, 1965.

STILL, W.C.; KAHN M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal Organic Chemistry**, v. 43, n 14, p. 1968-1970, 1978.

STRATTON, C. W. Strongyloidiasis. **Antimicrobial Infectious Diseases**, v.18, n. 3, p. 20-24, 2000.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFF, S.; FAIRLAMB, A.; GURTHUR, R. E.; McKERROW, J. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal Clinical Investigation**, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

TATAGIBA, F. Disponível em <http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/lobeira.jpg>>. Acesso em: 13 de nov. 2009.

VALLE, J. R. **A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectiva**. São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo. 1978. 288p.

VITAZKOVA, S.; LONG, E.; GLENDINNING, J. Mice suppress malaria infection by sampling a bitter chemotherapy agent. **Animal Behaviour**, v. 61, p. 887–894, 2001.

UDALOVA, Z.V.; ZINOVEVA, S.V.; VASILEVA, I.S.; PASESHNICHENKO, V.A. Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 93–97, 2004.

WAGNER, H. **Plant Drugs Analysis (A thin layer chromatograph atlas)**. Berlin. 1999. 320p.

WANG Y, LI LIU, CHUCHU HU, YIYU CHENG. Effects of *Salviae miltiorrhizae* and *Cortex moutan* extract on the rat heart after myocardial infarction: A proteomic study. **Biochemical pharmacology**, v. 74, p. 415-424, 2008.

WANYONYI, A.W.; CHHABRA, S.C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 79-84, 2002.

WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. **Phytochemistry**, v. 58, p. 501–508, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global health atlas. Geneva: WHO. Disponível em: <<http://apps.who.int/globalatlas/>>. Acessado em: 16 nov. 2009.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRIS, Y.; VANNERSTROM, J. L.; TANNER, M. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobiology Agents Chemother**, v. 51, n 4, p. 1440–1445, 2007.

YOSHIKAWA, M.; NAKAMURA, S.; OZAKI, K.; KUMAHARA, A.; MORUKAWA, T.; MATSUDA, H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, as antidiabetogenic constituents from the brazilian medicianl plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 210-214, 2007.

ZHA, X.; SUN, H.; HAO, J.; ZHANG, Y. Efficient synthesis of solasodine, oacetylsolasodine, and soladulcidine as anticancer steroidal alkaloids. **Chemistry and biodiversity**, v. 4, p. 25-31, 2007.