RAFAELA PAULA DE FREITAS

**Avaliação da atividade esquistossomicida
de análogos sintéticos da pipartina em
vermes adultos de *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2015

RAFAELA PAULA DE FREITAS

**Avaliação da atividade esquistossomicida de
análogos sintéticos da piplartina em vermes
adultos de *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Eliana Nakano

Co-orientador: Profa. Dra. Cristina
Northfleet de Albuquerque

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto na
biblioteca do ICB quanto na Biblioteca
Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Freitas, Rafaela Paula de.

Avaliação da atividade esquistossomicida de análogos sintéticos da piplartina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* / Rafaela Paula de Freitas. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Nakano.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: *Schistosoma mansoni*.

Versão do título para o inglês: Evaluation of schistosomicidal activity of synthetic analogs of piplartine in *Schistosoma mansoni* adult worms.

1. *Schistosoma mansoni* 2. Esquistossomose 3. Análogos sintéticos
4. Piplartina 5. REA 6. I. Nakano, Profa. Dra. Eliana II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0211/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rafaela Paula de Freitas.

Título da Avaliação da atividade esquistossomícida de análogos
 sintéticos da pipartina em vermes adultos de *Schistosoma*
 mansoni.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Nakano.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo da atividade de Análogos Sintéticos da amida Piplartina em *Schistosoma mansoni*” **protocolo nº 786/11**, sob a responsabilidade de Eliana Nakano e Rafaela Paula de Freitas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/02/2011.

We certify that the research entitled “Activity of Synthetic Analogues of piplartine in *Schistosoma mansoni*”, **protocol nº 786/11**, under the responsibility of Eliana Nakano and Rafaela Paula de Freitas, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/10/2011.

Vigência do Projeto: 02/2011 – 12/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório de Parasitologia	192 Hamsters Fêmeas 100 camundongos Suíços Fêmeas

São Paulo, 11 de fevereiro de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Dedico este trabalho a Yasmin,
minha filha, para demonstrar que
sempre deve correr atrás dos seus
sonhos por mais distantes que lhe
pareçam.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Anastácio e Alzeni, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu Marido José, pelas noites em claro, pelas ajudas concedidas e pelo encorajamento nos momentos de indecisão.

Aos meus irmãos, Icaro e Ruana, que apesar das brigas e discussões sempre nos apoiamos e nos incentivamos.

A Profa. Dra. Toshie Kawano e Dra. Suzete Gomes Rodrigues, por me receberem no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan e me permitirem iniciar um estágio voluntário e iniciar a minha trajetória na pesquisa acadêmica.

A Profa. Dra. Eliana Nakano, por aceitar a difícil tarefa de me orientar em uma área totalmente diferente da sua linha de pesquisa, sempre com muitos conselhos e recomendações, que me ajudaram não apenas nessa fase, mas em toda a minha vida, além disso pelo amor, carinho e amizade que foram crescendo a cada dia.

A Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque, pelos conselhos, reuniões e sugestões durante a dissertação e por aceitar com alegria a co-orientação.

A Profa. Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto pela paciência, ensinamento e por toda a ajuda na realização e na discussão da parte do SAR deste trabalho, e a sua aluna Bárbara pela realização do cálculo das propriedades.

Ao Prof. Dr Massuo Jorge Kato, pelo fornecimento dos derivados avaliados em especial e ao seu aluno de doutorado Harold Hilarion Foekoue, responsável pela síntese das amidas.

A Msc. Patricia Aoki por me ensinar a manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni*, por toda a ajuda durante os experimentos e as correções desta dissertação, pela amizade, confiança e companheirismo diário.

Ao Dr. Josué Moraes por me ensinar a avaliação da atividade esquistossomícida.

Aos Profs Dra Darci Moraes B. Battesti, Dra Maria Carolina, Dr Lincoln Suesdek da Rocha e Dr Ronaldo Zucatelli Mendonça, por compartilhar equipamentos e materiais. Em especial ao Dr Ronaldo Zucatelli Mendonça por aceitar a minha orientação até que fosse aceito o credenciamento da Dra Eliana Nakano no programa da Pós Graduação.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Parasitologia, com vocês encontrei uma nova e grande família, que me acolheram e me ajudaram com as conversas, apoios e as motivações em várias etapas que vivenciei nessa época do mestrado Pati, Li, Cris, Jurema, Carlos, Lurdinha, Arlete, Virginia, Ana, Lud, Fábio, Paloma, Simone, Henrique, Alex, Gigi, Dany, Paloma, Anita, Camila, Natália, Carol, Isabela, Vivian, Flávia, Ricardo, muitíssimo obrigada pela força.

As Profs Dra Dominique Corinne H. Fisher, Dra Flavia Saldanha Kubrusly e Dra Nancy Oguiura, pela disponibilidade e sugestões dadas durante o exame de qualificação.

A CAPES pelo apoio financeiro.

*Só existe uma maneira de evitar críticas:
não fazer nada, não dizer nada e não
ser nada...*

Aristoteles

Tudo o que um sonho precisa para ser
realizado é alguém que acredite que ele
possa ser realizado.

Roberto Shinyashiki

Quando você quer alguma coisa, todo o
universo conspira para que você realize
o seu desejo.

Paulo Coelho

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

FREITAS, R. P. **Avaliação da atividade esquistossomícida de análogos sintéticos da pipartina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni***. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As esquistossomíases são doenças produzidas por trematódeos do gênero *Schistosoma*, afetando milhões de pessoas. São doenças debilitantes, e afetam principalmente as populações das regiões mais carentes. O *Schistosoma mansoni* é a única espécie que transmite a doença no território brasileiro. Para completar o ciclo evolutivo, o parasita necessita de dois hospedeiros, que se infectam quando entram em contato com a água que contenha a forma evolutiva de *S. mansoni* específica para cada um. Inicialmente o controle da doença era realizado com o uso de moluscicidas, e somente na década de 70 foram empregados anti-helmínticos orais, sendo o praziquantel o único fármaco recomendado para o tratamento de todas as espécies de *Schistosoma*. Contudo, relatos isolados de helmintos resistentes foram descritos, tornando necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que extratos de plantas da família Piperaceae exibiam atividade esquistossomícida. A partir do extrato de *Piper tuberculatum* foi isolada a pipartina, um alcaloide-amida, que apresentou ação esquistossomótica contra vermes adultos e imaturos. Por não se conhecer o alvo envolvido e para ampliar o conhecimento sobre a atividade esquistossomícida, neste trabalho foi realizado o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica de derivados sintéticos da pipartina. Foram avaliados 36 derivados, com modificações em 3 regiões da estrutura da pipartina. O experimento para a determinação da atividade esquistossomícida foi dividido em duas fases: a primeira se destinou à triagem dos compostos sintetizados, quando foram observadas a motilidade e mortalidade de 5 casais de *S. mansoni* nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Na etapa seguinte, foi determinado o IC₅₀ (concentração letal para 50% dos vermes) dos compostos 100 por cento ativos em pelo menos uma das concentrações testadas na primeira etapa. Nessa fase, a análise foi realizada em triplicata com 10 casais de *S. mansoni* em cada ensaio. As modificações avaliadas nos derivados influenciaram negativamente a atividade quando comparadas com a pipartina, mas apresentaram uma seletividade gênero específica. De todos os derivados avaliados, seis tiveram o valor do IC₅₀ determinados, e os valores variaram de 72,33 a 216,86 µM. Verificou-se que mudanças no equilíbrio hidrófilo-lipófilo, na estereoquímica e na distribuição das cargas eletrostáticas, podem explicar as diferenças na atividade esquistossomícidas do conjunto de moléculas avaliadas.

Palavras Chave: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomícida. Análogos sintéticos. Pipartina. REA.

ABSTRACT

FREITAS, R. P. **Evaluation of schistosomicidal activity of synthetic analogs of piplartine in *Schistosoma mansoni* adult worms.** 2015. 77 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Schistosomiasis are debilitating diseases caused by trematodes from *Schistosoma* genus affecting millions of people mostly in the developing world. *Schistosoma mansoni* is the only species transmitting the disease in Brazil. To complete its life cycle, the parasite needs two hosts which are infected in contact with the water body containing the specific evolutive *S. mansoni* forms. Firstly, schistosomiasis control was performed with molluscicides; only in the 1970's, oral anthelmintics were employed. Praziquantel is the only recommended drug to the treatment of all *Schistosoma* species. However, sporadic reports on parasite resistance have been described, making urgent the search for new therapeutic options. Schistosomicidal activity of crude extracts from plants of Piperaceae family was described in our previous studies. An alkaloid-amide, piplartine, isolated from a *Piper tuberculatum* extract, exhibited schistosomicidal activity against adult and immature worms. The drug target and mechanism of action are still unknown. Thus, in the present work, we analyzed the structure and properties of a series of piplartine derivatives to propose a structure-activity relationship model. A total of 36 synthetic piplartine derivatives with modifications in three regions of the piplartine molecule were evaluated. All the modifications had a negative influence in the biological activity; nevertheless, a gender specific selectivity was observed. Schistosomicidal activity was evaluated in *S. mansoni* adult worms exposed in vitro to piplartine synthetic derivatives in a two phase study. First, a screening was performed by evaluating the motility and mortality of 5 pairs of *S. mansoni* exposed to 50 and 100 µg/mL. The derivatives that showed 100% of activity in at least one of the two concentrations were considered active. Next, IC₅₀ (lethal concentration to 50% of worms) values were determined for the selected compounds. In this phase, the analysis was performed in triplicate with 10 worm pairs. Of all the derivatives, 6 had the IC₅₀ values determined, ranging from 72,33 a 216,86 µM. Differences in the schistosomicidal activity between piplartine and its derivatives could be attributed to changes in shape, hydrophilic-lipophilic equilibrium and electrostatic charge distribution.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Schistosomicidal. Synthetic analogues. Piplartine. SAR.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFA: solução de ácido acético, formaldeído e álcool

DMSO: dimetilsulfoxido

IC₅₀: concentração necessária para causar 50% de mortalidade

MPE: Mapas de potencial eletrostático

PZQ: praziquantel

REA: Relações entre estrutura química e atividade biológica

RPMI 1640: meio de cultivo “Roswell Memorial Park Institute”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	16
Figura 2 Fotografia de <i>Piper tuberculatum</i>	27
Figura 3 Estrutura química da pipartina	27
Figura 4 Estrutura dos derivados sintéticos da pipartina.	33
Figura 5 Foto do <i>S. mansoni</i> e do caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i>	33
Figura 6 Manutenção do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	34
Figura 7 Triagem da atividade esquistossomicida dos derivados sintéticos da amida pipartina em casais de adultos de <i>S. mansoni</i>	42
Figura 8 Oviposição de <i>S. mansoni</i> após 120 horas de exposição aos derivados da pipartina.	52
Figura 9 Ilustração das regiões modificadas na estrutura da pipartina.	53
Figura 10 Ilustração dos anéis que substituíram o dihidropiperidinona presente na pipartina.	54
Figura 11 Modificações na região do anel dihidropiperidinona e a alteração na atividade biológica.	55
Figura 12 Principais modificações que influenciaram a atividade esquistossomicida na porção trimetoxibenzeno	56
Figura 13 Modificações empregadas na cadeia alifática presente entre os dois anéis que originaram fármacos inativos.	56
Figura 14 Mapas de potencial eletrostático (MPE) calculados nas superfícies moleculares para o fármaco pipartina, o derivado 15, o derivado 23 e o derivado 12.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fármacos empregados no tratamento da esquistossomose.....	20
Tabela 2 Efeito do derivado 3 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	45
Tabela 3 Efeito do derivado 12 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	46
Tabela 4 Efeito do derivado 15 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	47
Tabela 5 Efeito do derivado 16 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	48
Tabela 6 Efeito do derivado 19 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	49
Tabela 7 Efeito do derivado 35 na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i>	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Esquistossomose.....	14
1.2 Controle da Esquistossomose.....	17
1.3 Descoberta de novos fármacos antiparasitários.....	24
1.4 Estudo com <i>Piperacea</i>.....	25
1.5 Piplartina.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Compostos.....	31
3.2 Animais	33
3.3 Manutenção do ciclo de <i>S. mansoni</i>.....	34
3.4 Recuperação dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>.....	35
3.5 Experimentos in vitro com vermes adultos de <i>S. mansoni</i>.....	35
3.6 Avaliação da atividade esquistossomicida in vitro dos derivados da piplartina.....	36
3.7 Determinação do IC₅₀	36
3.8 Cálculo das propriedades moleculares.....	37
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Avaliação da Mortalidade de adultos de <i>S. mansoni</i> na presença dos derivados sintéticos da pipartina.....	39
4.2 Avaliação dos efeitos na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>S. mansoni</i> na presença dos derivados sintéticos da pipartina.....	44
4.3 Avaliação do efeito dos derivados da pipartina na oviposição de <i>S.</i> <i>mansoni</i>.....	51
4.4 Relação entre a estrutura química e a atividade biológica (REA) dos derivados sintéticos da pipartina.....	53
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

As esquistossomíases são doenças causadas por trematódeos do gênero *Schistosoma* (REY, 2008c). Seis espécies parasitam o homem: o *S. japonicum* encontrado na China e no Sudeste Asiático; o *S. mansoni* nas populações da África, Arábia e América do Sul; o *S. haematobium* encontra-se restrito a população da África e da Arábia; o *S. intercalatum* é encontrado na África Ocidental e Central; o *S. mekongi* é encontrado apenas no Delta do rio Mekong, localizado no sudeste da Ásia; e *S. malayensis* é restrito a Malásia. Destas, os *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* são as principais espécies responsáveis por transmitir a infecção no mundo (GRYSEELS, 2012).

São infecções pouco reconhecidas nas fases iniciais, e uma preocupação global de saúde pública, principalmente nas áreas endêmicas, por debilitar homens e mulheres durante seus anos mais produtivos. Atingem as populações que vivem em condições que favoreçam a transmissão e não têm acesso a cuidados adequados ou medidas eficazes de prevenção (ENGELS et al., 2002). Afetaram quase 250 milhões de pessoas em 2010 (ROLLINSON et al., 2013) e estima-se que ocorram 41.000 mortes anuais (GRYSEELS, 2012).

Entre as principais espécies de *Schistosoma* de mamíferos, o *S. mansoni* é endêmico em 54 países, a maioria na África subsaariana e partes do sul da América (CHITSULO et al., 2000), sendo esta a espécie de maior interesse médico e sanitário nas Américas (REY, 2008b) e a única responsável por transmitir a doença no território brasileiro.

No Brasil, país mais afetado nas Américas, estima-se que em 2010 quase 7 milhões de pessoas estavam infectadas (ROLLINSON et al., 2013). As áreas endêmicas mais importantes compreendem o norte do Maranhão e as regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, grande parte dos Estados de Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais e na Zona Serrana do Espírito Santo (REY, 2008b).

Os esquistossomos, o agente etiológico desta doença, são organismos complexos multicelulares, que têm co-evoluído com seus hospedeiros mamíferos

(VAN HELLEMOND et al., 2006). São endoparasitas, com simetria bilateral, corpo não segmentado, desprovidos de sistema circulatório, esquelético ou respiratório; o sistema digestório é incompleto terminando em fundo cego, e apresentam sexo separados (REY, 2008a).

Quando adultos (figura 5), são vermes macroscopicamente visíveis, os machos medem aproximadamente 1 cm de comprimento por 0,11 cm de largura, de cor branca, com o corpo achatado dorsoventralmente e enrolado de maneira a formar um tubo longitudinal conhecido como canal ginecóforo, onde a fêmea costuma estar alojada. A fêmea que tem o corpo cilíndrico, mais fino e mais longo que o do macho, mede de 1,2 a 1,6 cm de comprimento por 0,016 cm de diâmetro em média, é mais escura e acinzentada (REY, 2008c). Alimentam-se de células sanguíneas e globulinas, e os detritos são regurgitados no sangue humano. O metabolismo anaeróbico serve principalmente para os movimentos dos esquistossomos masculinos e a produção de ovos das fêmeas (GRYSEELS, 2012).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo e necessita dois hospedeiros, o intermediário é um molusco que pertence ao gênero *Biomphalaria* e o definitivo, geralmente o mamífero (MACHADO E SILVA et al., 2008). Apresentam diferentes formas evolutivas, sendo duas de vida livre encontradas nos rios, lagos e córregos – responsáveis pela infecção dos hospedeiros, e as formas encontradas no interior dos hospedeiros (REY, 2008c). A figura 1 ilustra as fases do ciclo evolutivo do *S. mansoni*.

Os ovos eclodem ao entrar em contato com a água e liberam a forma larvária ciliada denominada miracídio. Os miracídios nadam ativamente, e quando encontram um caramujo se aderem e penetram através do tegumento. No interior do caramujo, há a formação de uma membrana com células germinativas de esporocisto primário. Após o rompimento da membrana, os esporocistos filhos ou secundários são liberados, e continuam crescendo até se diferenciarem e formarem as cercárias, ou originarem os esporocistos terciários que permanecem se multiplicando. As cercárias provocam a formação de microvesículas e, quando estimuladas pela luz e calor, saem para o meio externo e se acumulam na superfície da água dos lagos ou córregos (COELHO, 1970; MACHADO E SILVA et al., 2008; REY, 2008c). No hospedeiro definitivo, as cercárias penetram pela pele ou mucosas, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que através da corrente sanguínea ou linfática são levados ao pulmão. Nesse órgão, os esquistossômulos

permanecem um período, onde passam por transformações, tornando-se mais delgados e compridos, depois são levados para os vasos intra-hepáticos e a circulação geral (PRATA; COURA, 2008). Após o acasalamento, os vermes adultos migram para as veias mesentéricas, onde a fêmea elimina seus ovos. Diariamente, cerca de 300 ovos são liberados pela fêmea; parte dos ovos liberados é arrastada para a circulação e depositados principalmente no baço, fígado e pulmões, o restante é eliminado pelo intestino através das fezes (QUACK et al., 2010).

Figura 1- Ciclo evolutivo do *S. mansoni*. Fonte: (BARBOSA et al., 2008).

A infecção por *S. mansoni* pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica, ambas podendo ser sintomáticas, oligossintomáticas ou assintomáticas (PRATA; COURA, 2008). A gravidade das manifestações clínicas está envolvida com a linhagem do parasita, a carga infectante, as condições fisiológicas tanto do parasita como do hospedeiro definitivo e a frequência com que ocorre a re-infecção. O curso da doença depende do tipo das reações locais e gerais, da reação do organismo na fase da invasão, das mudanças ocorridas durante o amadurecimento

dos vermes e das reações provocadas pela presença dos ovos no hospedeiro (ANDRADE, 1970; MACHADO E SILVA et al., 2008; REY, 2008d).

Na fase aguda os sintomas são decorrentes da penetração das cercarias e migração dos vermes jovens. Observam-se dois sintomas bem característicos: a dermatite cercariana e a febre Katayama. A dermatite cercariana varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, durando até cinco dias após a infecção. Já a febre Katayama surge de três a sete semanas após a exposição, caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. Devido a inespecificidade destes sintomas clínicos na fase aguda da doença, geralmente são ignorados pelo portador, o que acarreta a cronicidade da doença. Após esse período ocorre a maturação sexual e fecundação das fêmeas, e começam as complicações da fase crônica, sendo o fígado o órgão mais comprometido. Os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar diarreias repetidas, do tipo mucosanguinolenta ou não, dor abdominal, ascite e, em quadros mais graves, os pacientes podem apresentar circulação colateral e varizes esofagianas. Em casos mais raros os pacientes podem apresentar sintomas pulmonares (tais como dispneia e tosse seca) e neurológicos tais como encefalite aguda e vasculite cerebral. Os sinais e sintomas iniciais da doença incluem: dor lombar ou dor em membros inferiores, paraparesia, disfunções urinária e intestinal e impotência, nos homens (GRYSEELS, 2012; PRATA; COURA, 2008; SILVA et al., 2012).

1.2 Controle da Esquistossomose

Ao longo dos anos, programas de controle da disseminação da doença foram criados. As ações compreendem metas que vão além do controle da morbidade, apresentando como foco principal a interrupção do ciclo de vida do *S. mansoni* por meio de abordagens como: i) a quimioterapia; ii) o controle dos caramujos hospedeiros intermediários; iii) adequação das condições sanitárias; iv) fornecimento da água tratada, v) conscientização e educação sanitária da população, principalmente da que vive nas áreas endêmicas (FENWICK et al., 1987; KATZ; ALMEIDA, 2003; REY, 2008b).

O controle da esquistossomose foi realizado inicialmente com o uso de moluscidas sintéticos para o controle dos caramujos hospedeiros. Entre 1913 e 1915, foram empregadas várias substâncias não específicas para o controle dos caramujos hospedeiros tais como cal, cianeto de cálcio e sulfato de cobre (DUNCAN, 1985). Posteriormente, de 1945 a 1955, outros produtos como o pentaclorofenato de sódio e pentaclorofenol surgiram (JURBERG et al., 1989), porém, devido à baixa especificidade entre os organismos aquáticos, eles foram sendo substituídos. Atualmente, a niclosamida (Bayluscide WP70[®] – Bayer, Leverkusen, Bayerwerk, Alemanha) é o moluscida mais recomendado e utilizado nos programas de controle da doença. As aplicações deste produto têm demonstrado a redução temporária das populações de caramujos (TELES; CARVALHO, 2008).

O uso de quimioterápicos no tratamento da esquistossomose iniciou-se com o tártaro emético (CHRISTOPHERSON, 1918). Em seguida, diversos fármacos foram introduzidos, entretanto, o surgimento de muitos efeitos colaterais e tóxicos, associado à ocorrência de morte súbita de pacientes, levou à proscrição desses medicamentos (KATZ, 2008a; KATZ; ALMEIDA, 2003).

A revolução no tratamento quimioterápico ocorreu durante a década de 70, com a descoberta da oxamniquina e do praziquantel. Os ensaios clínicos realizados no Brasil mostraram que o tratamento por via oral com o oxamniquine apresentava boa tolerância, baixos efeitos colaterais e índice de cura acima de 60 por cento, (KATZ, 2008a). Entretanto, ensaios posteriores verificaram que a oxamniquina era inativo contra *S. japonicum* e *S. hematobium*. Cepas do Leste Africano de *S. mansoni* foram menos suscetíveis ao tratamento que as cepas do Novo Mundo (CIOLI et al., 1995) fazendo com que a utilização deste medicamento ficasse restrita ao Brasil.

O praziquantel mostrou uma ação anti-helmíntica polivalente nos ensaios clínicos, com taxas de cura de 80-90 por cento quando administrado por via oral (KATZ, 2008a). O amplo espectro de ação anti-helmíntico, poucos efeitos adversos e o baixo custo fizeram do praziquantel uma ótima opção terapêutica e o composto passou a ser empregado no controle da esquistossomose em todas as regiões endêmicas (KATZ, 2008a). Amplamente utilizado por quase 40 anos, ainda não foi verificado o desenvolvimento de resistência clínica generalizada ao praziquantel em nenhuma das principais espécies que infectam humanos, mesmo em áreas onde o

tratamento tem sido realizado por longos períodos de tempo (BLACK et al., 2009; BOTROS et al., 2005; GUIDI et al., 2010). No entanto, parasitas com menos sensibilidade ao praziquantel foram obtidos em experimentos de seleção artificial em laboratório (FALLON; DOENHOFF, 1994) e relatos de redução terapêutica semelhante foram registrados em estudos de campo (DOENHOFF et al., 2002; LIANG et al., 2001; LIANG et al., 2010; MELMAN et al., 2009). Ainda, estudos recentes demonstraram que o tratamento de vermes jovens e adultos com dose subletal de praziquantel induzia o aumento da expressão de diferentes proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (KASINATHAN et al., 2010).

Até o momento a busca por análogos ativos do praziquantel (PZQ) foram infrutíferas (DONG et al., 2010; LAURENT et al., 2008; RONKETTI et al., 2007) apesar de compostos protótipos para o tratamento da esquistossomose terem sido identificados (SAYED et al., 2008; SIMEONOV et al., 2008). Na tabela 1 encontramos um resumo das substâncias estudadas para compor o arsenal terapêutico esquistossomicida. Nesta tabela é possível verificar que a grande maioria dos fármacos avaliados entraram em desuso ou apenas foram avaliados os efeitos *in vitro* e *in vivo*, contudo os estudos clínicos para avaliar a sua efetividade na população ainda não prosseguiram. Atualmente apenas a oxamniquina e o metrifonato são os fármacos empregados no tratamento da esquistossomose causada pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* respectivamente, e o PZQ é o único ativo em todas as espécies do parasita. Nas campanhas de quimioterapia preventiva, uma dose anual de PZQ vem sendo distribuído para crianças em idade escolar ou comunidades inteiras. Mesmo após os excelentes resultados obtidos com as campanhas de tratamento em massa, várias barreiras precisam ser vencidas para eliminar a esquistossomose entre elas: a demanda do PZQ é maior que a quantidade oferecida, a existência de dificuldades na fiscalização e manutenção da periodicidade no tratamento da população durante a realização dessas campanhas que precisam ser realizadas por vários anos, a ausência de uma vigilância pós-intervenção e verificação da interrupção da transmissão efetiva da doença. Além disso, práticas como o controle de vetores, o fornecimento de água potável e saneamento básico e higiene, devem estar aliadas para erradicação da esquistossomose. Isso demonstra que a utilização do PZQ tende a aumentar, e, com isso, pode-se acelerar o risco de surgimento de resistência ou tolerância do parasita ao PZQ, por isso, torna-se necessária a aplicação de medidas que a curto prazo

aumentem a vida útil do praziquantel (BOCKARIE et al, 2013; WOELFLE et al., 2011).

Tabela 1- Fármacos empregados no tratamento da esquistossomose.

Ano ¹	Nome	Estrutura	Observação
1918	tártaro emético ^A		Início do uso de quimioterápicos; muito tóxico.
1920	emetina ^B		Moderadamente efetivo; tóxico.
1960	metrifonato ^B		Ainda usado contra <i>S. haematobium</i>
1962	nitrofuranos ^B		Moderadamente efetivos
1962	lucantona ^B		Substituído pela hancantona
1964	niridazol ^B		Moderadamente efetivo por via oral
1965	hancantona ^B		Uso interrompido, devido a mutagenicidade

1969	oxamniquina ^B		Ainda em uso em <i>S. mansoni</i> .
1971	tubercidina ^B		Análogo purina, testado apenas em animais.
1976	amoscanato ^B		Amplamente testado na China, tóxico.
1977	praziquantel ^B		Fármaco de referência no tratamento de todas as espécies de <i>Schistosoma</i> .
1978	meclonazepam Ro 113128 ^{B,C}		Efeito profilático e terapêutico em <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i> .
1978	oltipraz ^B		Uso interrompido: problema nas unhas.
1981	ciclosporina ^{A^B}		Somente testado em laboratório, profilático.

1984	hidrazona 9 acridina ^B		Ativo em animais, não testado em humanos
1985	artemisinina ^C		Tratamento de malaria resistente à cloroquina, potencial esquistossomicida
1989	arteméter ^{C,F}		Ativo contra as principais espécies de <i>Schistosoma</i> humano, tanto nas formas jovens e adultas do parasita.
1994	ácidos aminoalcano- tiosulfúrico ^E		Ativo contra <i>S.</i> <i>mansoni</i> in vitro como in vivo
2001	myrrh (Mirazid®) ^{C,D, F}	Látex resina oleosa obtida do caule de <i>Commiphora molmol</i> Engier	Resultados contraditórios referente ao potencial esquistossomicida.
2003	análogos nucleotídeo acíclico ^F		Atividade esquistossomicida in vitro e in vivo
2006	trioxolanas (OZ78) ^{C, D, F}		Análogo semi- sintético da artemisinina, ativo contra formas

		jovens e adultas de <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i>
2007	vinilsulfona (K11777) ^{C,D}		Inibidor de cisteína proteases. Reduziu a carga parasitária e a patologia.
2007	curcumina ^{F,H}		Potente atividade esquistossomicida in vitro e in vivo em <i>S. mansoni</i>
2007	tiosulfatos alquilamino alcanos ^{E,G}		Ativo em fêmeas do <i>S. mansoni</i> ; Tóxico.
2007	auranofina ^C		Ativo em todas as fases do <i>S. mansoni</i> .
2008	oxadiazol ^I		Ativo em todas as fases do <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i> .
2009	mefloquina ^F		Ativo in vitro e in vivo para <i>S. mansoni</i>
2010	ácido araquidônico ^F		Ativo em <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i>

¹- Ano da descoberta ou da publicação ^A-(CIOLI et al., 1995); ^B- (CIOLI, 1998); ^C-(ANGELUCCI et al., 2011); ^D- (ABDUL-GHANI et al., 2009); ^E-(CAFFREY, 2007); ^F- (EL RIDI; TALLIMA, 2013); ^G-(PENIDO et al., 2008); ^H- (MAGALHAES et al., 2009); ^I-(SAYED et al., 2008).

1.3 Descoberta de novos fármacos antiparasitários

A pesquisa de novos princípios biologicamente ativos representa o maior desafio na descoberta de novos fármacos. Para que isso ocorra, é necessária a junção de várias áreas do conhecimento, pois o processo aborda a descoberta, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo do metabolismo, o mecanismo de ação molecular e as relações entre a estrutura química e a atividade biológica (GALDINO; PITTA, 2011).

Ao encontrar uma substância que apresente uma atividade farmacológica desejada, esta é conhecida como um composto protótipo (PATRICK, 2009b). A procura por protótipos pode ser realizada a partir de diferentes abordagens. Dentre elas, a serendipidade ou a descoberta ao acaso, o ensaio randômico, no qual se avaliam várias substâncias aleatoriamente, a busca a partir dos produtos naturais, o estudo do metabolismo de fármacos na busca por moléculas mais ativas e a modificação molecular de fármacos conhecidos são empregadas quando há poucas informações sobre doença. Quando informações sobre o alvo molecular envolvido na doença e um respectivo ligante são conhecidas, pode-se empregar métodos de triagem virtual (GALDINO; PITTA, 2011; KINGHORN, 2008; KNITTEL; ZOVID, 2008; PATRICK, 2009b).

A busca de antiparasitários inicialmente é realizada de forma aleatória, através da triagem de uma série de compostos, pois pouco se conhece sobre os parasitas. Mesmo após a determinação do transcriptoma completo do *S. mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003), 55% dos genes de *S. mansoni* ainda não tem homologia fora do gênero; dos 45% restantes com um homólogo, quase metade não possui atribuição funcional (DEMARCO; VERJOVSKI-ALMEIDA, 2009).

Quando um protótipo é encontrado e não se conhecer o alvo envolvido, o objetivo é melhorar a atividade biológica obtida. A partir do estudo da relação entre a estrutura química do protótipo e a atividade biológica (REA), é possível distinguir quais as partes da molécula são importantes para a atividade biológica (PATRICK, 2009a; b; c). Tais informações podem ser obtidas a partir da avaliação de uma série de compostos produzidos por modificações estruturais específicas (PATRICK,

2009b). O estudo dos fatores que favorecem a interação de um fármaco com o alvo biológico pode ajudar no entendimento de como um conjunto de átomos, um grupo funcional ou uma subestrutura podem ser importantes para a atividade biológica (ALMEIDA, 2011). Para sintetizar moléculas com pequenas mudanças, diferentes abordagens são empregadas, tais como a simplificação ou a conservação molecular, a abertura ou fechamento de anéis ou pela incorporação de novos grupamentos (GALDINO; PITTA, 2011).

Uma vez estabelecidos os grupos importantes para a atividade biológica, passa-se para a etapa da identificação do farmacóforo (PATRICK, 2009a). O grupo farmacofórico é aquela parte essencial da molécula com arranjo estereoquímico específico responsável pelo reconhecimento, interação ou ligação com o alvo biológico. A partir do farmacóforo podem-se identificar as classes de compostos ativos, prever diferentes atividades por similaridade de um composto com atividades biológicas conhecidas, ou mesmo melhorar a potência e as propriedades farmacocinéticas de um composto de interesse farmacológico (ALMEIDA, 2011).

Os principais alvos moleculares para interação com os fármacos são proteínas – especialmente enzimas, receptores, proteínas de transporte, e canais iônicos – ácidos nucleicos e constituintes da parede celular (GALDINO; PITTA, 2011). A interação ocorre em uma área específica da biomacromolécula, que é conhecida como sítio de interação, e são mantidas por diferentes interações de ligação (PATRICK, 2009c). Essa interação ocorre quando há complementaridade estereoeletrônica do fármaco com o sítio de ligação; isto faz com que a forma espacial do fármaco seja um dos mais importantes fatores que afetam a atividade farmacológica (GALDINO; PITTA, 2011).

1.4 Estudo com *Piperacea*

Produtos naturais podem representar uma fonte promissora de compostos bioativos, já que se originam de uma fonte renovável de diferentes compostos de origem vegetal ou animal, obtidos do metabolismo primário ou secundário; são compostos biologicamente ativos utilizados há séculos pelo homem para prevenção ou cura de doenças. Apresentam estruturas privilegiadas do ponto de vista biológico, uma vez que evoluíram em conjunto com as proteínas durante suas biossínteses.

Exibem uma ampla e complexa diversidade química, com propriedades similares aos fármacos em uso (PUPO et al., 2007).

Com o intuito de encontrar novas substâncias químicas que apresentem atividade esquistossomicida, nosso grupo realizou a triagem de espécies pertencentes ao gênero *Piper* da família *Piperaceae*. Esse estudo foi baseado em diversos trabalhos que identificaram o potencial dessa família quanto à produção de compostos naturais bioativos (BERNARD et al., 1995; JENSEN et al., 1993; PARMAR et al., 1997; SENGUPTA; RAY, 1987). Entre as atividades observadas, destacam-se a antifúngica, a antimicrobiana e a inseticida (DYER et al., 2003; KATO; FURLAN, 2007; LOPEZ et al., 2002; NGONO NGANE et al., 2003; TERREAUX et al., 1998).

A família *Piperaceae* é uma das mais primitivas das Angiospermas, possui 14 gêneros e cerca de 3600 espécies, sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais representativos (KATO; FURLAN, 2007; MABBERLEY, 1997; SOUZA, 2005). No gênero *Piper*, foram identificados cerca de 2000 espécies (WANKE et al., 2007), que fazem com que esse seja o maior gênero das Angiospermas basais. Muitos estudos com *Piper* foram baseados no seu uso na medicina popular, como remédios para dores no estômago, agentes anti-inflamatórios, antipiréticos, no tratamento da asma e como repelentes de insetos (BEZERRA et al., 2013; JARAMILLO; MANOS, 2001; PARMAR et al., 1997; SENGUPTA; RAY, 1987).

No estudo realizado por nosso grupo, verificou-se a atividade dos extratos etanólicos de *Piper tuberculatum*, *Piper crassinervium*, *Piper diospyrifolium*, *Piper fuliginum*, *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata* em vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*. Os resultados obtidos mostraram que todos os extratos reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas ou alterações morfológicas no tegumento, efeitos esses diretamente dependentes da concentração, do tempo de incubação e da idade dos helmintos. Houve redução de oviposição nos grupos dos vermes expostos às concentrações subletais (MORAES, 2011). Dentre os extratos avaliados, o obtido de *Piper tuberculatum* apresentou 100 por cento de atividade esquistossomicida na concentração de 4 µg/mL em vermes adultos. Em esquistossômulos, fase imatura dos parasitas, este valor foi de 15 µg/mL (MORAES, 2011). Na figura 2 é mostrada essa espécie.

Apesar do gênero *Piper* apresentar uma composição fitoquímica muito diversificada, as amidas constituem a classe mais característica de compostos. Em

estudos realizados com 10 por cento das espécies identificadas, constatou-se que as amidas estão presentes em quase 75 por cento delas (DYER; PALMER, 2007). Foram isoladas das espécies de *Piper* diversos grupos de amidas como os alcanidas, amidas do grupo pirrolidínicas, piperidônicas e piperidínicas, contendo grupamentos metilenodioxifenila e amidas de cadeia aberta. Dentre as amidas presentes nesse gênero, a piplartina é um importante alcaloide/amida descrito em algumas espécies de *Piper* (*P. retrofractum*, *P. tuberculatum*, *P. arborens*, *P. divaricatum*, *P. sylvaticum*, *Piper nigrum*, *P. longum* e *Piper chaba*) (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2005; BODIWALA et al., 2007; COTINGUIBA et al., 2009; DA SILVA et al., 2002; MORAES et al., 2011; DUH et al., 1990; FELIPE et al., 2007; FONTENELE et al., 2009; JYOTHI et al., 2009; LIN et al., 2007; MARQUES, 2009; RODRIGUES et al., 2009; TSAI et al., 2005).

Figura 2- Fotografia de *Piper tuberculatum*. Fonte: Kato, 2014^{*}

1.5 Piplartina

Figura 3- Estrutura química da piplartina. (programa Chems sketch, 2012).

^{*} KATO, J. M. São Paulo, 2014. Foto cedida de arquivo pessoal.

A piplartina (figura 3) foi isolada pela primeira vez da espécie *Piper longum* em 1961; também chamada de piperlongumina, teve sua estrutura caracterizada em 1963 (ATAL; BANGA, 1963; BEZERRA et al., 2013; CHATTERJEE; DUTTA, 1967) e apenas em 1984 foi publicada a descrição de sua síntese (BOLL et al., 1984). Já foram descritas diferentes atividades biológicas da piplartina como a antitumoral (BEZERRA et al., 2008), antimetastática (RAJ et al., 2011), inibição de aflatoxina B1 (LEE et al., 2002) antiagregante plaquetária (FONTENELE et al., 2009; PARK et al., 2008; TSAI et al., 2005), analgésica (RODRIGUES et al., 2009), ansiolítica e antidepressiva (FELIPE et al., 2007), antiangiogênica (RAJ et al., 2011), antiaterosclerótica (SON et al., 2012) e antidiabética (RAO et al., 2012).

Verificou-se que a piplartina apresentou forte ação biocida contra os *fungos* *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (DA SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2000), contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* e *Staphylococcus aureus* (NAIKA et al., 2010) e em caramujos *Biomphalaria glabrata*, tanto em adultos quanto em embriões nos diferentes estágios (RAPADO et al., 2013). A piplartina também atua em diferentes parasitas, agindo como uma molécula tripanocida, (COTINGUIBA et al., 2009; GOMES et al., 2009; SILVA et al., 2007), leishmanicida, em testes in vitro e in vivo sobre promastigota (BODIWALA et al., 2007).

Alguns estudos analisaram as relações entre a estrutura química e a atividade biológica e toxicológica com análogos da piplartina. Verificou-se que ambas as atividades estão envolvidas com a presença do grupo carbonila α , β insaturado e que a redução ou substituição de qualquer um dos dois grupamentos insaturados originaram moléculas sem citotoxicidade e com atividade reduzida (BEZERRA, 2008; BEZERRA et al., 2013; COTINGUIBA et al., 2009).

Nos estudos com *S. mansonii* realizados em nosso laboratório, a piplartina induziu a mortalidade de 100% dos parasitas adultos expostos na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (MORAES et al., 2011) e 2 $\mu\text{g/mL}$ na fase de esquistossômulos (MORAES et al., 2012), e em concentrações subletais, a piplartina alterou a motilidade e a oviposição de maneira dose dependente (MORAES et al., 2011). Estas concentrações estão dentro do limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para a realização de triagem de compostos protótipos com atividade antiparasitária (PINK et al., 2005).

Neste trabalho, foram empregadas técnicas que iniciaram a busca por informações que elucidem as relações entre a estrutura química e a atividade esquistossomicida de derivados da piplartina. Para a identificação dos grupos essenciais para a atividade biológica, foram avaliadas as diferenças nas respostas obtidas a partir de ensaios in vitro com vermes adultos de *S. mansoni* expostos a derivados sintéticos da piplartina e a avaliação de algumas propriedades moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as relações entre a estrutura química e a atividade esquistossomicida de uma série de derivados da pipartina, a partir de ensaios in vitro em casais de vermes adultos de *S. mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a mortalidade dos parasitas de *S. mansoni* expostos aos derivados;
- Determinar o valor do IC₅₀ derivados ativos;
- Investigar o acasalamento, a oviposição e a motilidade dos derivados ativos;
- Avaliar as modificações moleculares dos derivados que influenciaram na atividade biológica;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos

Os derivados foram sintetizados no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química pelo aluno de doutorado Harold Hilarion Fokoue, sob a orientação do Professor Dr Massuo Jorge Kato. Para a síntese dos derivados foi empregada a rota de formação das amidas a partir dos ácidos correspondentes usando o cloreto de acila como agente ativador ou o diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento. Os compostos foram conservados em temperatura ambiente protegidos da luz. As estruturas dos derivados encontram-se na figura 4.

Cloreto de oxacila

Porção *N,N*-dibutil

Porção *N*-butil

Porção 2-piperidinona

Porção piperidinil

Porção 3,5-dimetilpiperidina

Figura 4- Estrutura dos derivados sintetizados usando dois agentes ativadores diferentes, o DCC e o cloreto de acila. Os compostos foram divididos segundo a modificação da porção amida do anel da piplartina.

3.2 Animais

O ciclo do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) foi mantido em caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e hamsters (*Mesocricetus auratus*) (figura 5). A linhagem BH do parasita, proveniente de Belo Horizonte, MG e os caramujos descendentes de espécimes de Barreiro de Baixo, Belo Horizonte, MG vem sendo mantidos há muitos anos no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Os caramujos foram mantidos em aquários contendo água filtrada com aeração constante, em temperatura ambiente e alimentados com alface fresca. Os hamsters foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, SP, mantidos em caixas de polietileno contendo maravalha, alimentados com ração e água. As caixas foram armazenadas em uma estante ventilada de biotério em condições de temperatura e circulação de ar constantes.

Figura 5- Foto do *S. mansoni* e do caramujo *Biomphalaria glabrata*. a) Casal de *S. mansoni*; o macho é o transparente e a fêmea é a mais escura, aumento 40x. b) Caramujo *B. glabrata*, aumento 6,3x. Em ambas as imagens a escala empregada foi de 500µm.

3.3 Manutenção do ciclo de *S. mansoni*

Para a manutenção do ciclo de *S. mansoni*, os hamsters foram infectados subcutaneamente com seringa de 1 ml com cerca de 300 cercárias. Após aproximadamente 42 dias, os hamsters foram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada do fígado e obtenção dos ovos a partir dos quais são obtidos os miracídios.

Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de cultura de células com 24 poços contendo água filtrada e 10 miracídios. A exposição dos moluscos aos miracídios foi realizada sob luz artificial de lâmpada incandescente de 60 W durante 4 horas. Após 35 dias, os moluscos foram colocados sob a luz artificial por 40 a 60 minutos para a eliminação das cercárias. Estas foram utilizadas na infecção dos hamsters. Essa manutenção está ilustrada na figura 6.

Figura 6- Manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni*. 1 Ovos do *S. mansoni*; 2- Miracídio; 3- caramujo *Biomphalaria glabrata*; 4- Cercária; 5- Hamster; 6- casal de vermes adultos de *S. mansoni*.

3.4 Recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni*

Para a recuperação dos vermes adultos foi utilizada a técnica de perfusão do sistema porta hepático, conforme descrito por Pellegrino e Siqueira, (1956). Após 42 dias da inoculação das cercárias, os hamsters foram sacrificados por inalação de CO₂ e realizou-se uma incisão longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. Em seguida, cortou-se a veia porta e, com auxílio de uma bomba peristáltica, injetou-se 200 mL de solução de meio RPMI (pó para preparo de 1 L; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo heparina (Blausiegel, São Paulo, SP, Brasil) na artéria aorta ou diretamente no coração para expelir os vermes adultos.

3.5 Experimentos in vitro com vermes adultos de *S. mansoni*

Para determinar a atividade esquistossomicida, o experimento foi dividido em duas fases: a primeira se destinou à triagem de todos os compostos sintetizados; nessa etapa foram observadas a motilidade e mortalidade de 5 casais de *S. mansoni* nas concentrações de 100 e 50 µg/mL do derivado. Os derivados que causassem 100 por cento de mortalidade em pelo menos uma das duas concentrações foram submetidos à etapa seguinte do estudo, a determinação do IC₅₀. Nessa fase, a análise foi realizada em triplicata com 10 casais de *S. mansoni* em cada ensaio, e observaram-se os padrões de motilidade, acasalamento, oviposição e mortalidade no decorrer de 120 horas de exposição.

Em todos os experimentos, após a perfusão, os vermes adultos de *S. mansoni* foram lavados 3 vezes em tubo Falcon (Sarstedt, Newton, USA) com uma solução tamponada de RPMI, suplementada com penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml (Sigma-Aldrich Corporation) e anfotericina 2 µg/mL (Cultilab). Em seguida, acondicionou-se os parasitas em placas de cultura de células com 24 poços, sendo 1 casal de parasitas por poço, contendo 500 µL de meio RPMI 1640 tamponado com bicarbonato, suplementado com 10 por cento de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina 2 µg/ml (Cultilab). A placa contendo os vermes foi incubada em estufa a 37 °C antes da solubilização dos derivados.

Todos os derivados foram previamente pesados e acondicionados em microtubos (Axygen Inc, Union City, CA, USA). No momento do uso, cada derivado

foi solubilizado em 10 por cento de DMSO (Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, adicionou-se quantidade suficiente do meio RPMI acrescido de soro, antibiótico e antifúngico em cada microtúbulo até se obter a concentração de 1mg do derivado em 1 mL de solução. Em seguida foi preparada uma solução contendo o dobro da concentração final desejada para cada derivado, e em cada uma a concentração do DMSO foi mantida em 2 por cento.

Por fim, adicionou-se em cada poço 500 µL de cada concentração da solução do derivado. Praziquantel (Sigma-Aldrich Corporation, St, Louis, MO, USA) 6 µg/mL foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura com DMSO 1 por cento, como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5 por cento e monitoradas diariamente por até 120 horas, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (MORAES et al., 2011).

3.6 Avaliação da atividade esquistossomicida in vitro dos derivados da piplartina

As culturas de vermes adultos foram continuamente monitoradas em microscópio ou lupa, em intervalos fixos após 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação, analisando o padrão de motilidade e mortalidade. A motilidade do parasita é definida como movimento que oscila de rápido encurtamento e prolongamento do corpo até movimentos ondulatórios ou ondas peristálticas presente ao longo do corpo, parcial ou de uma extremidade a outra (DA SILVA; NOEL, 1995). Foram considerados mortos os vermes que não se movimentassem em até 2 minutos após a movimentação da placa (KEISER, 2010; RAMIREZ et al., 2007; XIAO; CATTO, 1989).

3.7 Determinação do IC₅₀

Considerando que as mortes dos vermes foram observados em intervalos de tempo fixo, desta forma, tem-se um problema estatístico de análise de sobrevivência de dados com censura intervalar. A censura intervalar é caracterizada pelo fato de não saber exatamente o tempo de morte do verme. Por exemplo, se no tempo de observação 24 h, foi observado um verme morto, isso significa que o verme morreu

entre 2 h e 24 h. Neste sentido, optou-se pelo do método da máxima verossimilhança para estimação do modelo de sobrevivência Weibull para dados com censura intervalar (Sun, 2006). Sendo assim, a função de verossimilhança é dada por

$$L(\eta, \beta_0, \beta_1 | a, b, x) = \prod [Pr(T < b_i | \eta, \beta_0, \beta_1, x_i) - Pr(T < a_i | \eta, \beta_0, \beta_1, x_i)],$$

em que, a_i e b_i são limites do intervalo de tempo observado para a morte do i -ésimo verme (isto é, se o verme morreu entre 2 h e 24 h, então $a_i = 2$ e $b_i = 24$), x_i é a dose utilizada, b_0 , b_1 , h são os parâmetros, tais que $0 < b_0 < 1$, $0 < b_1 < 1$, $h > 0$ e

$$Pr(T < y | \eta, \beta_0, \beta_1, x) = 1 - \exp \left\{ - \left(\frac{y}{\exp(\beta_0 + \beta_1 x)} \right)^\eta \right\}.$$

Obtendo-se as estimativas dos parâmetros, a IC_{50} , como função do tempo t , pode ser calculada por

$$IC_{50}(t) = \left\{ \log \left(\frac{t}{[\log(2)]^{1/\eta}} \right) - \hat{\beta}_0 \right\} \hat{\beta}_1^{-1}.$$

Note que, a IC_{50} depende do tempo de exposição do verme (t). Para cada t a IC_{50} será diferente. Espera-se que quanto maior o tempo decorrido, maior a mortalidade de vermes. Desta forma, quanto maior o tempo, menor será a dose necessária para matar 50 por cento dos vermes, por outro lado, quanto maior a dose, menor será o tempo necessário para ocorrer a morte de 50 por cento dos vermes.

Além disso, considerou-se um modelo para cada derivado, sendo um modelo para os machos e outro modelo para as fêmeas. Foram analisados 6 compostos, com um total de 12 modelos estimados.

Dada a complexidade do problema e a dificuldade em obter-se os intervalos de confiança para a IC_{50} , utilizou-se o método de bootstrap para obtenção dos intervalos de confiança. O método de bootstrap é um método não-paramétrico baseado em um procedimento de reamostragem (EFRON; TIBSHIRANI, 1993).

3.8 Cálculo das propriedades moleculares

Estudo preliminar de modelagem molecular e cálculo de propriedades moleculares foi desenvolvido em colaboração com a Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, para o

protótipo piplartina e 3 derivados representativos do conjunto de moléculas investigado. Selecionaram-se dois derivados mais promissores (**12**, mais ativo em fêmeas; e **15**, mais ativo em machos) e um derivado menos ativo (**23**).

Foram calculadas as propriedades eletrônicas (mapa de potencial eletrostático, MPE; cargas atômicas parciais de potencial eletrostático) para avaliar a conformação e a disposição das cargas nessas quatro moléculas selecionadas. Para a realização do cálculo dessas propriedades, utilizou-se o método de teoria do funcional de densidade (DFT) B3LYP (Becke, 1993) e conjunto de bases 6-31G(d,p) (Gaussian 03W/GaussView 5.0; Gaussian, Inc.).

A lipofilicidade (coeficiente de partição *n*-octanol/água calculado, ClogP) foi calculada para avaliar a permeabilidade dessas moléculas entre as membranas biológicas. Para o cálculo do ClogP, utilizou-se método de Viswanadhan et al. (1989) (Marvin 5.1, ChemAxon Ltd., 1998-2012).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Mortalidade de adultos de *S. mansoni* na presença dos derivados sintéticos da piplartina

Neste trabalho, a atividade esquistossomicida foi avaliada pela observação de parasitas diretamente expostos por até 120 horas aos derivados sintéticos da piplartina.

Dos 36 derivados avaliados, não apresentaram nenhuma atividade esquistossomicida na fase de triagem nas concentrações de 50 e 100 µg/mL 24 derivados: **2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 34 e 36.**

Dos 12 compostos que induziram a mortalidade dos parasitas, os resultados obtidos com o **1, 3, 11, 12, 15, 16, 19, 21, 22, 30, 33 e 35** demonstram que este parâmetro foi diretamente dependente da concentração e do tempo de incubação dos compostos e em alguns compostos houve diferença na resposta entre os gêneros macho e fêmea do *S. mansoni* conforme verificamos na Figura 7.

Composto 11

Composto 12

Composto 15

Composto 16

Composto 19

Composto 21

Composto 22

Composto 30

Figura 7- Triagem da atividade esquistossomicida dos derivados sintéticos da amida piplartina em casais de adultos de *S. mansoni*. Os parasitas foram incubados em meio RPMI e monitorados nos tempos indicados. Os valores foram obtidos de ensaios únicos contendo 5 casais de vermes por concentração.

Seis derivados, **3**, **12**, **15**, **16**, **19**, e **35** causaram 100 por cento de mortalidade dos helmintos avaliados, e tiveram o valor do IC₅₀ determinados (figura 8).

Derivado	Estrutura	IC ₅₀ Macho (μM)	IC ₅₀ Fêmea (μM)	IC ₅₀ Macho (μg/mL)	IC ₅₀ Fêmea (μg/mL)
Composto 3		157,65	135,03	65,35	55,97
Composto 12		125,99	72,33	44,66	25,64
Composto 15		84,10	91,18	29,48	31,96
Composto 16		100,10	102,76	31,98	32,83
Composto 19		84,74	95,45	21,98	24,76
Composto 35		216,86	141,27	46,68	30,41
Piartina		7,87 ^a	7,87 ^a	2,50	2,50

^a - Valores retirados de Moraes et al. (2013).

Figura 8- Valor do IC₅₀ para determinação da atividade esquistossomicida dos derivados sintéticos da amida piartina em casais de adultos de *S. mansoni*. Os parasitas foram incubados em meio RPMI e foram monitorados por até 120 horas. Os valores foram obtidos de diferentes ensaios replicados contendo 10 casais de vermes por concentração.

Nesses seis derivados ativos, também verificamos a diferença entre os valores do IC₅₀ obtidos para o parasita macho e fêmea, sendo as fêmeas mais sensíveis aos derivados **3**, **12** e **35**, e os derivados **15**, **16** e **19** mais ativo aos machos (figura 9).

Já, os derivados **1**, **11**, **21**, **22**, **30** e **33** não induziram 100 por cento de mortalidade dos parasitas em nenhuma das concentrações avaliadas; o derivado **22** ocasionou 60 por cento de mortalidade dos parasitas machos e fêmeas. Com os outros 5 derivados restantes, foi possível identificar diferenças na resposta biológica

quando avaliamos os dois sexos do parasita em separado. Na figura 7, verificamos que as parasitas fêmeas foram mais suscetíveis aos derivados **21**, **30** e **33**. 100 por cento das parasitas fêmeas morrem após 48 horas de exposição ao derivado **21**; e com os derivados **30** e **33**, foram observadas, após 120 horas de exposição, 40 por cento e 60 por cento de mortalidade dos parasitas fêmeas. Já, os machos foram mais sensíveis aos derivados **1** e **11**, nos quais verificamos 100 por cento e 80 por cento de mortalidade após 72 e 120 horas de exposição respectivamente.

4.2 Avaliação dos efeitos na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni* na presença dos derivados sintéticos da piplartina

Neste trabalho, avaliamos os efeitos dos derivados **3**, **12**, **15**, **16**, **19** e **35** selecionados na triagem sobre o padrão de motilidade e do acasalamento de *S. mansoni*. A motilidade foi diariamente monitorada e a redução na atividade motora foi qualitativamente definida como “leve” ou “significativa” (KEISER, 2010; MORAES et al., 2011; MORAES, 2012; XIAO et al., 2007).

Os dados mostraram que para todos os derivados avaliados tanto as respostas da separação dos casais expostos aos compostos como a alteração da motilidade dos parasitas foram dose-dependentes. Os resultados dessas análises estão descritos nas tabelas 2 a 7.

Enquanto a separação dos parasitas expostos aos derivados **3**, **12**, **15** e **19** ocorreu próximo da concentração de 20 µg/mL, nos derivados **16** e **35**, essa separação foi observada com 31 µg/mL e 37 µg/mL respectivamente. Já as alterações na motilidade começaram a ser perceptíveis e permanecer nas concentrações superiores a partir de 12,5 µg/mL no derivado **12**, 34 µg/mL no derivado **15**, 31 µg/mL no derivado **16**, 19 µg/mL no derivado **19**, 48 µg/mL no derivado **35**, e não foi identificado, em nenhuma das concentrações avaliadas, alterações significativas na motilidade na maioria dos parasitas expostos ao derivado **3**.

Tabela 2- Efeito do derivado **3** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 3 ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0^c	2	0,0	17,8	0,0	0,0
	24	0,0	2,2	0,0	0,0
	48	0,0	2,2	0,0	0,0
	72	0,0	2,2	0,0	0,0
	96	0,0	2,2	2,2	0,0
	120	0,0	2,2	4,5	0,0
20	2	0,0	35,0	0,0	0,0
	24	0,0	95,0	5,0	0,0
	48	0,0	100,0	2,5	2,5
	72	5,0	100,0	40,0	5,0
	96	12,5	100,0	25,0	22,5
	120	17,5	100,0	30,0	22,5
40	2	0,0	100,0	22,5	0,0
	24	0,0	100,0	35,0	10,0
	48	10,0	100,0	77,5	2,5
	72	10,0	100,0	50,0	40,0
	96	30,0	100,0	0,0	70,0
	120	45,0	100,0	5,0	50,0
60	2	0,0	95,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	25,0	40,0
	48	25,0	100,0	42,5	25,0
	72	32,5	100,0	15,0	52,5
	96	65,0	100,0	0,0	35,0
	120	90,0	100,0	0,0	10,0
80	2	0,0	95,0	0,0	0,0
	24	35,0	100,0	0,0	15,0
	48	50,0	100,0	30,0	0,0
	72	50,0	100,0	27,5	22,5
	96	60,0	100,0	10,0	30,0
	120	77,5	100,0	2,5	20,0
100	2	0,0	95,0	50,0	0,0
	24	32,5	100,0	5,0	17,5
	48	50,0	100,0	42,5	0,0
	72	50,0	100,0	2,5	47,5
	96	72,5	100,0	5,0	22,5
	120	95,0	100,0	2,5	2,5
PZQ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=90 parasitas

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Tabela 3- Efeito do derivado **12** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 12 ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0^c	2	0,0	0,0	2,5	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	2,5	0,0
12,5	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	15,0	85,0	15,0
	48	0,0	65,0	17,5	82,5
	72	0,0	85,0	17,5	82,5
	96	17,5	95,0	12,0	88,0
	120	32,5	95,0	4,0	96,0
25	2	0,0	10,0	0,0	0,0
	24	0,0	65,0	27,5	72,5
	48	0,0	95,0	0,0	100,0
	72	2,5	100,0	0,0	100,0
	96	27,5	100,0	7,0	93,0
	120	45,0	100,0	0,0	100,0
35	2	0,0	50,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	50,0	50,0
	48	0,0	100,0	22,5	77,5
	72	2,5	100,0	0,0	100,0
	96	27,5	100,0	0,0	100,0
	120	45,0	100,0	0,0	100,0
50	2	0,0	50,0	0,0	0,0
	24	0,0	85,0	67,5	32,5
	48	25,0	100,0	10,0	90,0
	72	35,0	100,0	0,0	100,0
	96	60,0	100,0	0,0	100,0
	120	82,5	100,0	0,0	100,0
75	2	0,0	85,0	0,0	0,0
	24	7,5	100,0	59,5	40,5
	48	37,5	100,0	0,0	100,0
	72	37,5	100,0	0,0	100,0
	96	90,0	100,0	0,0	100,0
	120	95,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 40 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=80 parasitas.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Tabela 4- Efeito do derivado **15** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 15 ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0^c	2	0,0	7,1	0,0	0,0
	24	0,0	1,4	0,0	0,0
	48	0,0	1,4	0,0	0,0
	72	0,0	1,4	14,3	0,0
	96	0,0	1,4	15,7	0,0
	120	0,0	4,3	12,9	0,0
19	2	0,0	5,0	0,0	0,0
	24	0,0	40,0	0,0	0,0
	48	0,0	50,0	0,0	0,0
	72	0,0	45,0	5,0	0,0
	96	0,0	70,0	12,5	0,0
	120	0,0	100,0	90,0	5,0
22	2	2,5	75,0	0,0	2,5
	24	5,0	95,0	0,0	5,0
	48	5,0	95,0	0,0	5,0
	72	5,0	100,0	0,0	5,0
	96	5,0	100,0	2,5	5,0
	120	7,5	100,0	70,0	22,5
25	2	0,0	100,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	35,0	0,0
	48	0,0	100,0	5,0	0,0
	72	0,0	100,0	95,0	0,0
	96	0,0	100,0	47,5	50,0
	120	17,5	100,0	27,5	55,0
28	2	0,0	100,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	50,0	0,0
	48	0,0	100,0	55,0	0,0
	72	0,0	100,0	97,5	2,5
	96	7,5	100,0	30,0	62,5
	120	25,0	100,0	0,0	75,0
34	2	0,0	8,0	95,0	0,0
	24	50,0	100,0	37,5	12,5
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=140 parasitas.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Tabela 5- Efeito do derivado **16** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 16 ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0 ^c	2	0,0	2,2	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	4,4	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	22,2	0,0
	96	0,0	0,0	24,2	0,0
	120	0,0	4,4	20,0	0,0
28	2	0,0	65,0	48,0	0,0
	24	0,0	95,0	55,0	7,5
	48	0,0	95,0	65,0	0,0
	72	0,0	95,0	73,0	0,0
	96	0,0	95,0	95,0	0,0
	120	0,0	95,0	92,5	7,5
31	2	0,0	85,0	47,5	0,0
	24	0,0	100,0	85,0	2,5
	48	0,0	100,0	100,0	0,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0
	96	2,5	100,0	87,0	13,0
	120	22,5	100,0	64,5	35,5
34	2	0,0	95,0	50,0	0,0
	24	0,0	100,0	72,5	0,0
	48	0,0	100,0	82,2	2,5
	72	35,0	100,0	38,5	61,5
	96	87,5	100,0	0,0	100,0
	120	95,0	100,0	0,0	100,0
42	2	0,0	85,0	92,5	0,0
	24	47,5	100,0	95,2	4,8
	48	50,0	100,0	90,0	10,0
	72	62,5	100,0	6,7	93,3
	96	97,5	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=90 parasitas.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Tabela 6- Efeito do derivado **19** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 19 ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0 ^c	2	0,0	2,2	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	4,5	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	22,2	0,0
	96	0,0	0,0	24,5	0,0
	120	0,0	4,5	20,0	0,0
16	2	0,0	20,0	0,0	0,0
	24	0,0	50,0	0,0	0,0
	48	0,0	50,0	0,0	0,0
	72	0,0	50,0	45,0	0,0
	96	0,0	50,0	40,0	5,0
	120	2,5	50,0	13,0	36,0
19	2	0,0	45,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	0,0	0,0
	48	0,0	100,0	2,5	0,0
	72	0,0	100,0	100,0	0,0
	96	0,0	100,0	85,0	10,0
	120	17,5	100,0	57,5	42,5
22	2	90,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	79,0	11,0
	96	100,0	100,0	42,0	58,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
25	2	85,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	50,0	0,0
	48	100,0	100,0	8,0	38,0
	72	100,0	100,0	24,0	76,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
50	2	90,0	100,0	68,0	18,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=90 parasitas.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Tabela 7- Efeito do derivado **35** na atividade motora e no acasalamento de adultos de *S. mansoni*.

Derivado 35 ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0^c	2	0,0	18,0	2,0	0,0
	24	0,0	0,0	4,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	20,0	0,0
	96	0,0	0,0	22,0	0,0
	120	0,0	4,0	20,0	0,0
37	2	0,0	5,0	0,0	0,0
	24	0,0	40,0	92,5	7,5
	48	0,0	80,0	70,0	30,0
	72	5,0	90,0	44,7	47,4
	96	7,5	95,0	54,0	46,0
	120	15,0	100,0	58,8	41,2
42	2	0,0	0,0	40,0	0,0
	24	5,0	65,0	100,0	0,0
	48	17,5	85,0	49,0	51,0
	72	32,5	95,0	26,0	74,0
	96	50,0	95,0	10,0	90,0
	120	70,0	95,0	16,67	83,0
48	2	0,0	0,0	10,0	0,0
	24	2,5	90,0	95,0	5,0
	48	20,0	100,0	22,0	78,0
	72	37,5	100,0	4,0	96,0
	96	52,5	100,0	0,0	100,0
	120	87,5	100,0	0,0	100,0
55	2	0,0	5,0	0,0	0,0
	24	0,0	75,0	83,0	18,0
	48	12,5	95,0	14,0	86,0
	72	27,5	100,0	0,0	100,0
	96	47,5	100,0	0,0	100,0
	120	75,0	100,0	0,0	100,0
75	2	0,0	5,0	48,0	2,5
	24	0,0	100,0	50,0	25,0
	48	23,0	100,0	29,0	71,0
	72	68,0	100,0	23,0	77,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,d}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 40 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c n=100 parasitas.

Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a dois experimentos feitos em 10 casais.

Nesta avaliação, observamos que todos os derivados, com exceção do **19**, induziram separação dos casais de *S. mansoni* em concentrações muito inferiores às necessárias para a ação esquistosomicida. O derivado **3** induziu a separação de 100 por cento dos casais com 20 µg/mL e a concentração letal para todos os casais foi 100 µg/mL. Já o derivado **12** causou 100 por cento de separação dos casais com 25 µg/mL e morte com 75 µg/mL. Com relação ao derivado **15**, a separação ocorreu com 19 µg/mL e a mortalidade apenas com 34 µg/mL. Com o derivado **16**, a separação ocorreu com 31 µg/mL e a mortalidade com 42 µg/mL. Com o derivado **35**, a separação ocorreu com 37 µg/mL e a mortalidade com 75 µg/mL. Com o derivado **19**, a separação ocorreu com 19 µg/mL e a mortalidade com 22 µg/mL. O praziquantel não induziu separação dos pares de *S. mansoni*.

Em nenhuma das concentrações letais dos derivados, independentemente do tempo de incubação, foi verificada a indução da contração muscular nos parasitas. Por outro lado, o praziquantel 3 µg/ml induziu, nos instantes iniciais, a contração dos helmintos e redução na motilidade.

4.3 Avaliação do efeito dos derivados da piplartina na oviposição de *S. mansoni*

O efeito dos derivados da piplartina em concentrações letais e subletais sobre a capacidade reprodutiva de *S. mansoni* foi avaliado por meio da análise do acasalamento e da oviposição.

A partir do monitoramento dos adultos acasalados de *S. mansoni*, foi possível constatar uma redução na oviposição dos parasitas de maneira dose dependente nas concentrações subletais dos derivados, conforme apresentado na figura 9.

Figura 8- Oviposição de *Schistosoma mansoni* após 120 horas de exposição aos derivados da piplartina.

Verificamos que com exceção do derivado **19**, todos os outros 5 derivados reduziram drasticamente o número de ovos em concentrações muito inferiores às necessárias para matar 100 por cento dos parasitas expostos. Observamos que quase chegou a zero a média de ovos contados nos derivados **12**, **15**, **16** e **35** a partir de 10µg/mL, 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL respectivamente, permanecendo esse padrão até as últimas concentrações avaliadas. Para o derivado **3** verificamos uma pequena oscilação no gráfico, demonstrando uma pequena falta de correlação na dose resposta desse composto na concentração de 25 µg/mL. Já para o derivado **19**, verificamos que até a concentração de 16 µg/mL, a curva da oviposição é descendente, entre essa concentração e a de 19 µg/mL (concentração onde se inicia a separação de todos os parasitas), observa-se a

formação de um platô, que decresce até chegar a concentração de 22 µg/mL, depois observa-se a ascensão da reta e novamente o seu declínio a quase zero na concentração de 50 µg/mL.

4.4 Relação entre a estrutura química e a atividade biológica (REA) dos derivados sintéticos da piplartina

Para a análise da REA da piplartina, os derivados foram sintetizados a partir da modificação de três regiões (figura 9).

Figura 9- Ilustração das regiões modificadas na estrutura da piplartina.

As maiores modificações estruturais foram realizadas na porção dihidropiridinona, originando 8 grupos de compostos, sendo que o grupo tendo a porção 1,3 diclohexilurêia foi o mais numeroso em derivados obtidos, conforme está ilustrado na figura 10.

Figura 10- Ilustração dos anéis que substituíram o dihidropiperidinona presente na piplartina.

Na região do anel dihidropiperidinona foram realizadas a substituição deste anel por anéis de dimetilpiperidina (derivados **29** e **30**), morfolina (derivados **31** e **32**), piperidinil (derivados **24**, **25**, **26**, **27** e **28**), 2-piperidinona (derivado **23**) ou por um anel pirrolidinona (derivados **31**, **32**, **33**, **34**, **35** e **36**) e com exceção do derivado **35** (figura 11), todas essas modificações originaram derivados sem atividade biológica. Nessa região, as moléculas que apresentaram atividade tanto tiveram a adição de um grupo volumoso, representado pelos derivados **3** e **12**, como a abertura do anel com a manutenção da amida terciária, derivados **15**, **16** e **19**. Quando o anel foi aberto e adicionado apenas uma cadeia acíclica, os derivados obtidos, **20**, **21** e **22**, foram inativos (figura 12).

Figura 11- Modificações na região do anel dihidropiperidinona e a alteração na atividade biológica.

Verificamos que a remoção de uma metoxila da posição meta do anel benzeno influencia na resposta biológica, mas não a anula, conforme observamos nos derivados **3** e **16**; já a remoção completa das metoxilas pouco altera a resposta biológica dos derivados, como representado pelos derivados **19** e **35** (figura 12). Contudo, a presença da metoxila apenas na posição para, assim como a presença de um halogênio nessa posição ou a substituição dessa região por um anel benzodioxol anulou a atividade esquistossomicida dos derivados **5**, **7**, **9**, **11**, **17**, **18**. A atividade biológica também foi anulada na substituição desse anel por uma cadeia alifática, como representado pelos derivados **13** e **22** (figura 13).

Figura 12- Principais modificações que influenciaram a atividade esquistossomicida na porção trimetoxibenzeno

A presença da dupla ligação entre as duas regiões modificadas parece ser importante para a atividade biológica, pois todos os derivados que foram sintetizados sem a dupla ligação, **2**, **4**, **6**, **8**, **10**, **13** e **22**, não apresentaram atividade biológica (figura 13). Além disso, parece que a distância existente entre os dois anéis também desempenha um papel importante na atividade biológica, pois, tanto o derivado **26**, que manteve a $\alpha \beta$ instauração, como o derivado **27**, que não possuía nenhuma insaturação na cadeia alifática, foram inativos (figura 14).

Figura 13- Modificações empregadas na cadeia alifática presente entre os dois anéis que originaram fármacos inativos.

A fim de visualizar a distribuição de densidade eletrônica do fármaco piplartina e dos derivados **12** (ativo em fêmeas), **15** (ativo em machos) e **23** (menos ativo), foram calculados os MPE (figura 14) nas superfícies moleculares, que traduzem a

forma (estereoquímica) destes compostos. Além disso, a lipofilicidade que pode ser expressa por meio dos valores de ClogP também foi considerada. Esta propriedade molecular está relacionada à capacidade de uma molécula em transpor barreiras biológicas. Valores mais positivos de ClogP indicam um caráter mais hidrofóbico e valores mais negativos indicam caráter mais hidrofílico. As propriedades moleculares são diretamente relacionadas à estrutura química, que é responsável pelo efeito farmacológico esperado de uma molécula. Então, diferenças nas propriedades moleculares calculadas podem auxiliar o entendimento das diferenças observadas na atividade esquistossomícida entre os derivados e em relação ao protótipo, piplartina, além de auxiliar na proposição de novas estruturas com atividade otimizada.

Figura 14- Mapas de potencial eletrostático (MPE) calculados nas superfícies moleculares para o fármaco piplartina (a), o derivado 15 (b), o derivado 23 (c) e o derivado 12 (d), (Gaussian 03W/GaussView; Gaussian Ltd.). A interpretação dos MPE é baseada em esquema de cores. Neste estudo, a cor vermelha intensa representa regiões de maior distribuição de densidade eletrônica (mais negativas; -0,04) e a cor azul representa as regiões de menor distribuição de densidade eletrônica (mais positivas; 0,04) na superfície molecular.

Observando a figura 14 pode-se perceber que os derivados apresentam conformações distintas do fármaco piplartina, ou seja, as superfícies moleculares, que traduzem a estereoquímica, são diferentes.

Em relação à propriedade eletrônica MPE, na região do anel aromático substituído com 3 grupos OCH_3 (metoxila), a piplartina (figura 14a) e os derivados **15** (b) e **23** (c) apresentaram distribuição de densidade eletrônica similares. No entanto, maior distribuição de densidade eletrônica pode ser observada no anel aromático (cor mais amarela) para os derivados **15** e **23** em relação ao fármaco protótipo (cor mais esverdeada no anel aromático). Os oxigênios dos grupos metoxila e dos

grupos carbonila apresentam maior distribuição de densidade eletrônica (cor vermelha intensa). O valor de ClogP para o fármaco piplartina foi 1,74.

O derivado **15** (figura 14b) apresenta a superfície mais neutra (cor verde predomina de uma extremidade à outra) em relação à piplartina e ao derivado **23**. A presença de cadeias alquílicas ligadas ao átomo de nitrogênio na região oposta ao anel aromático justificaria a distribuição de densidade eletrônica do derivado **15**, que apresentou valor de ClogP igual a 3,95, ressaltando o caráter mais hidrofóbico.

O derivado **23** (figura 14c) possui a superfície com menor distribuição de densidade eletrônica (predominância de regiões em azul de uma extremidade à outra) que as demais moléculas investigadas. Este derivado também apresentou o menor valor de ClogP (1,66), enfatizando o caráter mais hidrofílico em comparação aos derivados **12** e **23** e ao protótipo. A diferença estrutural entre o derivado **23** e o fármaco é a ausência de insaturações.

O derivado **12** (figura 14d) apresenta diferenças estruturais (substituições) em relação às demais moléculas. Há a presença de ciclohexanos ligados aos dois átomos de nitrogênio. Além do mais, neste derivado o anel aromático é não substituído. As modificações moleculares determinaram propriedade estereoquímica distinta, traduzida pela forma molecular de V invertido. A molécula é mais neutra (verde/amarelo predominam) considerando a distribuição de densidade eletrônica, com regiões mais negativas (cor vermelha intensa) na região dos oxigênios dos dois grupos carbonílicos. O valor de ClogP para este derivado foi 5,03, enfatizando o caráter hidrofóbico.

5 DISCUSSÃO

As pesquisas por novos fármacos anti-helmintícos para o controle da esquistossomose buscam moléculas que atendam a requisitos mínimos e específicos de acordo com as características apresentadas pelo praziquantel. Portanto, procura-se por medicamentos mais seguros para serem administradas em crianças, idosos ou mulheres grávidas, preferencialmente de uso oral; se for injetável, a administração deve ser em dose única ou semanal; que necessite de um curto período de tratamento e a cura seja atingida no máximo em 14 dias; custos menores que os tratamentos já existentes; estabilidade sobre condições tropicais, e atividade contra todas as espécies, estágios e formas da infecção, incluindo as cepas resistentes (PINK et al., 2005).

Tendo em vista a necessidade de novos fármacos para o controle e tratamento da esquistossomose, nosso grupo veio ao longo dos anos desenvolvendo parcerias e pesquisas para a identificação de novos compostos moluscicidas e esquistossomicidas. Em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química, foi identificada a piplartina, um alcalóide amida que apresentou atividades em ambos os ensaios.

A excelente atividade esquistossomicida demonstrada, associada à ausência de informações sobre o mecanismo de ação e a existência de poucos alvos biológicos identificados nesse parasita, demonstraram a necessidade de se conhecer melhor a ação anti-parasitária da piplartina.

Neste trabalho foram avaliados 36 derivados sintéticos da piplartina. Os compostos **3**, **12**, **15**, **16**, **19** e **35** ocasionaram 100 por cento de mortalidade na fase de triagem e tiveram os valores do IC₅₀ determinados. Apesar dos derivados **1**, **11**, **21**, **30** e **33**, não ocasionarem 100 por cento de mortalidade dos parasitas, foi possível identificar diferenças na resposta biológica quando avaliamos os dois sexos do parasita em separado, diferindo do resultado observado por Moraes et al., 2011, com a piplartina, que não apresentou diferenças na atividade entre os gêneros em *S. mansoni*. Pudemos verificar que os derivados **21**, **30** e **33** foram mais ativos em parasitas fêmeas, já os derivados **1** e **11** foram mais ativos nos machos (figura 7), o mesmo pode ser verificado com os derivados ativos, sendo que os derivados **3**, **12** e

35 foram mais efetivos contra as fêmeas, e os derivados **15**, **16** e **19** contra os machos.

A partir desses achados, pode-se inferir que algumas das modificações estruturais influenciaram na sensibilidade entre os gêneros. Já foram descritas na literatura diferenças morfológicas, nutricionais e biológicas entre os parasitas machos e fêmeas (REY, 2008c) contudo, essas diferenças ainda não foram abordadas e nem discutidas na avaliação da atividade esquistossomicida. Alguns autores observaram que os machos são mais suscetíveis aos extratos de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), à oxaminquina e ao praziquantel (CIOLI et al., 1995; LIANG et al., 2001; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; SANDERSON et al., 2002). Já as fêmeas foram mais sensíveis aos ácidos N-alquilamino-alcano-tiossulfúricos e ao artenusato (MITSUI et al., 2009; PENIDO et al., 2008).

Apesar dos métodos para avaliação de fármacos esquistossomicidas terem sido recentemente revisados, a análise fenotípica de vermes ainda é a metodologia de escolha na triagem de anti-helmínticos (ABDULLA et al., 2009; KEISER, 2010; MORAES, 2012; RAMIREZ et al., 2007); essa abordagem é vantajosa por ser um processo simples, direto, de baixo custo e de facilidade operacional (NOEL, 2008), e mesmo sendo subjetivo, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios in vitro (KEISER, 2010; MORAES et al., 2011; MORAES, 2012; XIAO et al., 2007). A partir dessa técnica é possível distinguir a viabilidade e o fenótipo dos helmintos imparcialmente e rapidamente (ABDULLA et al., 2009; KEISER, 2010; MORAES, 2012; RAMIREZ et al., 2007).

Além da mortalidade, avaliamos o padrão de motilidade e acasalamento dos parasitas expostos aos derivados selecionados, e verificamos diferenças importantes em cada derivado. No derivado **3**, a concentração necessária para separar todos os parasitas (20 µg/mL) foi muito inferior à necessária para iniciar a mortalidade (100 µg/mL), e não foi observada nenhuma alteração na motilidade que indicasse que os parasitas iriam morrer, já que não foram observadas alterações significativas na motilidade em nenhuma das concentrações avaliadas. Para este derivado foi verificada uma seletividade maior para as parasitas fêmeas, sendo o IC₅₀ de 135,03 µM, contra 157,65 µM para os parasitas machos.

No derivado **12**, verificamos um processo crescente de alterações que culminaram na morte dos parasitas. Com 12,5 µg/mL, observamos alterações significativas na motilidade dos parasitas expostos, que permaneceram crescentes

nas concentrações superiores. Já com 25 µg/mL, todos os parasitas estavam separados, e com 75µg/mL foi observada mortalidade de todos os vermes. Além dessas constatações, foi verificado que o composto **12** apresentou uma seletividade para as parasitas fêmeas, sendo este o derivado mais potente desta série avaliada para esse gênero, com IC₅₀ de 72,33 µM; já nos parasitas machos, o IC₅₀ foi de 125,99 µM.

No derivado **15**, verificamos que tanto a mortalidade como as alterações significativas na motilidade ocorreram com 34 µg/mL. Já a separação dos casais foi observada com 19 µg/mL. Com relação a este derivado, não foi possível identificar uma especificidade significativa entre os gêneros do *S. mansoni*, já que o valor de IC₅₀ obtido foi de 84,10 µM para os machos e 91,18 µM para fêmeas.

No derivado **16**, tanto a separação dos casais como as alterações na motilidade, foram observadas na mesma concentração de 31 µg/mL e com 42 µg/mL foi observada a morte de todos os parasitas expostos. Com este derivado também não foi verificada a seletividade entre os parasitas já que observamos que os valores de IC₅₀ para os parasitas machos foi de 100,10 µM e de 102,76 µM para as fêmeas.

Com o derivado **19**, também foi observada a separação dos casais e a alteração significativa da motilidade na mesma concentração, como observado no derivado **16**. A concentração necessária para separar os casais e alterar a motilidade dos parasitas foi de 19 µg/mL, e com 22 µg/mL foi observada mortalidade em 100 por cento dos vermes expostos. Este composto também apresentou uma pequena seletividade para os parasitas machos, sendo de 84,74 µM o valor de IC₅₀ identificado; já, para as fêmeas, foi de 91,18 µM.

O derivado **35** apresentou o mesmo padrão identificado no derivado 15, sendo que, com 37 µg/mL ocorreu a separação dos casais, com 48 µg/mL, a alteração na motilidade e com 75 µg/mL, a mortalidade de todos os parasitas. Este composto foi mais seletivo para as fêmeas dos parasitas, sendo este o derivado com o maior valor de IC₅₀ identificado nos dois gêneros, com o valor de 141,47 µM para as fêmeas, e 216,86 µM para os machos.

Na piplartina, tanto a separação dos casais, como as alterações na motilidade e a mortalidade foram verificadas na mesma concentração com 3 µg/mL, e não foi identificada nenhuma diferença na resposta obtida para os parasitas machos e fêmeas (MORAES et al., 2011).

Na literatura, já foi constatado que o sistema nervoso e muscular dos helmintos é essencial para muitos dos principais determinantes do comportamento tais como, percepção sensorial, localização no hospedeiro, invasão, locomoção, adaptação, alimentação e reprodução. Assim, alterações nesses sistemas podem estar associadas com a paralisia ou a morte dos parasitas. Recentemente, tem se verificado que a atividade anti-helmíntica de vários fármacos que atingem os parasitas pode estar relacionada com a ação moduladora nesses sistemas do helminto, através de interações ocorridas principalmente em canais iônicos ativados por neurotransmissores clássicos. Dentre os neurotransmissores averiguados pode-se citar a acetilcolina, γ -ácido aminobutírico (GABA) e glutamato, seguido de outros canais iônicos associados com os sinais de transmissão de sinal clássicos (MCVEIGH et al., 2012).

Há suposições de que alguns compostos esquistossomicidas como, por exemplo, oxamniquina, metrifonato, hancantona, lucantona e imidazolidinas causam alterações na motilidade dos parasitas por atuarem em receptores de acetilcolina (CIOLI et al., 1995). No entanto neste trabalho, não foi verificado se as alterações na motilidade dos parasitas ocasionadas pelos derivados estavam relacionadas com a interação de algum canal iônico; ainda é desconhecido se a piplartina pode ou não interferir com canais iônicos e estudos posteriores com a piplartina precisam ser realizados.

A partir do monitoramento dos adultos acasalados de *S. mansoni*, foi possível constatar uma redução na oviposição do parasita de maneira dose dependente nas concentrações subletais dos derivados. Esses resultados estão de acordo com os observados por Moraes et al. (2011); no entanto, foi observada após a exposição aos derivados redução superior ao observado para a piplartina, que reduziu 76 por cento a oviposição (MORAES et al., 2011), enquanto os derivados induziram quase 99 por cento de redução em média.

Alguns trabalhos têm reportado, a partir de estudos morfológicos, que a redução na oviposição pode ser causada por alterações no sistema reprodutivo dos machos ou das fêmeas. Alterações degenerativas, com redução e alteração dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos foram observadas após a exposição à lovastatina, um potente inibidor de síntese endógena de colesterol (ARAÚJO et al., 2002). Já a estreptozotocina, uma indutora de *diabetes mellitus*, ocasionou atrofia dos lobos testiculares e ovários,

afetando a oogênese e espermatogênese de *S. mansoni* (HULSTIJN et al., 2003). Também foram verificados degeneração e atrofia em ovários e testículos de esquistossomos expostos ao artemeter (XIAO; CATTO, 1989).

A avaliação da oviposição foi realizada, pois a patologia da esquistossomose está associada, principalmente, à presença de ovos de *Schistosoma* no tecido do hospedeiro (GRYSEELS et al., 2006; WILSON et al., 2007). Por isso, na busca de novos medicamentos esquistossomicidas deve-se considerar substâncias que inibam a oviposição e, portanto, eliminem o principal agente patogênico, além de interromper a transmissão da helmintose (KATZ, 2008b).

Quando correlacionamos o padrão de acasalamento com a redução na oviposição, verificamos que essa redução pode ter sido influenciada pela separação dos casais. Para o composto **3**, pois apenas se verificou a redução drástica no número de ovos nas concentrações superiores às necessárias para separar 100 por cento dos casais. Com o composto **19**, verificamos na concentração de 22 µg/mL (valor este superior ao necessário para iniciar a separação de todos os parasitas), a ascensão da reta e posteriormente o seu declínio. Já nos derivados **12**, **15**, **16** e **35** observou-se a redução na oviposição em concentrações inferiores às necessárias para causar a separação dos casais de *S. mansoni*. Foram avaliados os órgãos reprodutivos dos parasitas expostos a alguns dos derivados selecionados, e não se observou nenhuma alteração morfológica; resultados similares também foram verificados com os parasitas expostos a piplartina (dados não mostrados). Portanto outros fatores além da separação ou lesões nos órgãos internos influenciaram a redução da oviposição nos derivados **12**, **15**, **16**, **19** e **35**.

Devido a ausência de informações sobre a atividade esquistossomicida da piplartina, as relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos derivados sintéticos da piplartina foram investigadas, visto que essas informações podem contribuir no processo de descoberta de novos protótipos. Verificou-se que a substituição de um átomo de H por um determinado substituinte (como grupo metoxila, nitro, halogênio, etc.) modifica de forma importante a potência, mas alterações em grupos ou regiões específicas das moléculas podem alterar ainda a duração e a natureza do efeito farmacológico. Essas modificações podem influenciar as propriedades físico-químicas da molécula e a análise dessas informações podem orientar as sínteses de novas moléculas (URETSKY; ROBERTSON, 2004).

Ao estudarmos moléculas em que um grupo funcional particular tenha sido removido ou alterado podemos identificar e separar os grupos essenciais para a atividade. Se um análogo mostra atividade significativamente reduzida, o grupo que foi modificado deve ser importante, porém se a atividade permanecer semelhante, o grupo não é essencial (PATRICK, 2009a). Esses estudos são importantes porque partem do princípio de que moléculas de série congêneres apresentam propriedades físico-químicas e efeitos biológicos semelhantes (LILL, 2007).

Alguns estudos de avaliação das relações entre a estrutura química e a atividade biológica e toxicológica de um conjunto de análogos da piplartina demonstraram que ambas as atividades estão envolvidas com a presença do grupo carbonila α , β insaturado, e a redução ou substituição de qualquer um dos dois grupamentos insaturados origina uma molécula sem citotoxicidade, e com atividades reduzidas (BEZERRA, 2008; BEZERRA, 2013; COTINGUIBA et al., 2009).

Em nosso trabalho, o grupo carbonila α , β insaturado na cadeia alifática presente entre os dois anéis foi importante para a atividade esquistossomicida dos derivados. Esta região manteria o arranjo conformacional favorável à atividade por aproximar os dois anéis, diminuindo a distância entre os grupos químicos além de permitir a distribuição de uma nuvem eletrônica de um extremo ao outro da molécula. Isso contribuiria para explicar os nossos resultados da mortalidade dos parasitas que mostraram que todos os derivados que foram sintetizados sem a dupla ligação (**2**, **4**, **6**, **8**, **10**, **13** e **22**) não apresentaram atividade biológica importante.

O grupo carbonila α β insaturado no anel hexeno parece ser dispensável, já que os derivados **12** e **15** apresentaram atividade biológica, porém foram menos potentes que a piplartina. Acredita-se que a adição de grupos mais polares, em posição oposta às carbonilas, pode contribuir para o caráter mais hidrofílico, observado na piplartina, que foi perdido em todos os outros 3 compostos avaliados (MEP, figura 14). Essa modificação molecular conferiria melhor equilíbrio hidrófilo-lipófilo aos novos derivados, fazendo com que o valor de ClogP se aproximasse mais do valor encontrado para a piplartina (ClogP = 1,74).

As quatro moléculas selecionadas para o cálculo de propriedades moleculares foram: o fármaco protótipo (mais potente do conjunto), um composto ativo mais específico para parasitas fêmeas (derivado **12**), um composto ativo mais específico para parasitas machos (derivado **15**) e um composto menos ativo e

estruturalmente mais semelhante ao protótipo (derivado **23**; ausência de insaturações).

De um modo geral, verificamos que todas as modificações empregadas nos derivados foram menos favoráveis à atividade esquistossomícida em relação ao protótipo. No entanto, identificaram-se compostos com potencial para serem específicos para o gênero. De acordo as propriedades moleculares calculadas para o protótipo e para os derivados **12**, **15** e **23**, as modificações resultaram em mudança de arranjo conformacional (forma; superfícies moleculares), de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (ClogP) e de distribuição de densidade eletrônica (MEP) em relação à molécula da piplartina.

Dentre as porções modificadas, parece que a porção 1,3,5-trimetoxibenzeno e a insaturação na cadeia alifática são as regiões mais sensíveis às modificações, pois a simples retirada de uma metoxila na posição meta do anel aromático reduz drasticamente a atividade biológica. A ausência da atividade foi verificada em todos os derivados sintetizados sem a insaturação na cadeia alifática. Contudo, mais derivados precisam ser sintetizados para avaliar quais as modificações que podem ser realizadas.

6 CONCLUSÕES

- 1- Os derivados sintéticos da piplartina estudados apresentaram uma atividade inferior à observada para a piplartina.
- 2- No entanto, foi possível identificar especificidade entre gêneros, sendo o composto **15** o mais efetivo contra os parasitas machos e o **12** para as fêmeas.
- 3- Todos os compostos avaliados apresentaram respostas dose—dependentes e tempo—dependentes para a mortalidade, motilidade e acasalamento.
- 4- Mudanças na estereoquímica, no equilíbrio hidrófilo-lipófilo (valores de ClogP) e na distribuição de densidade eletrônica (MPE) podem explicar as diferenças na atividade esquistossomicidas dos derivados e da piplartina.
- 5- As modificações realizadas na porção trimetoxibenzeno e a remoção da dupla ligação foram as que mais afetaram a atividade esquistossomicida.

REFERÊNCIAS²

- ABDUL-GHANI, R. et al. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. Parasitol. Res., v. 104, n. 5, p. 955-965, Apr 2009.
- ABDULLA, M. H. et al. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 3, n. 7, p. e478, 2009.
- ALMEIDA, V. L. Estudos de QSAR de furanobenzoanidinas frente a *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Síntese de análogos furânicos S-isotioureídeos. 2011. 154 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2011.
- ANDRADE, Z. A. Imunopatologia. In: CUNHA, A. S. (Ed.). Esquistossomose mansoni. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1970. p. 61-73.
- ANGELUCCI, F. et al. Macromolecular bases of antischistosomal therapy. Curr. Top. Med. Chem., v. 11, n. 16, p. 2012-2028, 2011.
- ARAÚJO, N. et al. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35, p. 35-38, 2002.
- ATAL, C. K.; BANGA, S. S. Structure of Piplartine - A new alkaloid from Piper longum. Current Science, v. 32, n. 8, p. 354-355, 1963.
- BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia e controle da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S et al. (Ed.). Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Brasil: Fiocruz, 2008. p. 965-1008
- BERNARD, C. B. et al. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. J. Chem. Ecol., v. 6, n. 21, p. 801-814, 1995.
- BEZERRA, D. P. et al. Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from piper species. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, v. 60, n. 7-8, p. 539-543, 2005.
- BEZERRA, D. P. Estudo das propriedades anticâncer da pipartina. 2008. 274 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2008.
- BEZERRA, D. P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with pipartine and piperine. Journal of Applied Toxicology, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008a.
- BEZERRA, D. P. et al. Overview of the therapeutic potential of pipartine (piperlongumine). Eur. J. Pharm. Sci., v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

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

BODIWALA, H. S. et al. Antileishmanial amides and lignans from Piper cubeba and Piper retrofractum. Journal of Natural Medicines, v. 61, n. 4, p. 418-421, 2007.

BOLL, P. M. et al. Synthesis and molecular-structure of pipartine (=Piperlongumine). Tetrahedron, v. 40, n. 1, p. 171-175, 1984.

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

CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. Current Opinion in Chemical Biology, v. 11, n. 4, p. 433-439, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHATTERJEE, A.; DUTTA, C. P. Alkaloids of Piper longum Linn. I. Structure and synthesis of piperlongumine and. Tetrahedron, v. 23, n. 4, p. 1769-1781, 1967.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. Acta Tropica, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

CHRISTOPHERSON, J. B. The successful use of antimony in bilharziosis - Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). Lancet, v. 2, p. 325-327, 1918.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. Parasitology Today, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.

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

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

COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypansomal agents. Medicinal Chemistry Research, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.

DA SILVA, R. V. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

DA SILVA, S. P.; NOEL, F. Time course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment in vitro: comparison with its effects on worm length and motility. Parasitol. Res., v. 81, n. 7, p. 543-548, 1995.

DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. Drug Discov. Today, v. 14, n. 9-10, p. 472-478, 2009.

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

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

DUH, C. Y. et al. Cytotoxic Pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. Journal of Natural Products, v. 53, n. 6, p. 1575-1577, 1990.

DUNCAN, J. The toxicology of plants molluscicides. Pharmacol. Ther., v. 27, n. 2, p. 243-264, 1985.

DYER, L. A. et al. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist. J. Chem. Ecol., v. 29, n. 11, p. 2499-2514, 2003.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution. 2007.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. An introduction to the Bootstrap. Chapman & Hall/CRC. 1993.

EL RIDI, R. A. F.; TALLIMA, H. A. M. Novel therapeutic and prevention approaches for Schistosomiasis: review. Journal of Advanced Research, v. 4, n. 5, p. 467-478, 2013.

ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Tropica, v. 82, n. 2, p. 139-146, 2002.

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

FELIPE, F. C. B. et al. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. Phytomedicine, v. 14, p. 605-612, 2007.

FENWICK, A. et al. The role of molluscicides in schistosomiasis control. Parasitology Today, v. 3, n. 3, p. 70-73, 1987.

FONTENELE, J. B. et al. Antiplatelet effects of pipartine, an alkaloid isolated from *Piper tuberculatum*. J. Pharm. Pharmacol., v. 61, n. 4, p. 511-515, 2009.

GALDINO, S.; PITTA, I. Descoberta de Fármacos. In: MONTANARI, C. (Ed.). Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. p. 7-46.

GOMES, K. S. et al. Piperamidas naturais e sintéticas como modelos de substâncias anti-chagásicas e antifúngicas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009. Anais... São José do Rio Preto, SP, 2009.

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

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. Lancet, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

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

HULSTIJN, M. et al. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. Parasitology, v. 126, n. 1, p. 53-61, 2003.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). Am. J. Bot., v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JENSEN, S. et al. Lignans and neolignans from Piperaceae. Phytochemistry, v. 33, p. 523-530, 1993.

JURBERG, P. et al. Plantas empregadas como moluscidas: uma visão crítica. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, p. 76-83, 1989.

JYOTHI, D. et al. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of pipartine isolated from *Piper chaba*. Toxicol. In Vitro, v. 23, n. 6, p. 1085-1091, 2009.

KASINATHAN, R. S. et al. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 173, n. 1, p. 25-31, 2010.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure and Applied Chemistry, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.

KATZ, N. Terapêutica Clínica da Esquistossomose Mansoni. In: CARVALHO, O. S.; et al. (Ed.). Schistossoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, 2008a. p. 850-856.

KATZ, N. Terapêutica Experimental da Esquistossomose Mansoni. In: CARVALHO, O. S. et al. (Ed.). Schistossoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, 2008b. p. 823-847.

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

KEISER, J. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. Parasitology, v. 137, n. 3, p. 589-603, 2010.

KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural products. In: LEMKE, T. (Ed.). Foye's principle of medicinal chemistry. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters kluwer Health, 2008. p. 9-23.

KNITTEL, J. J.; ZOVID, R. M. Drug design: relationship of functional groups to pharmacologic activity. In: LEMKE, T. (Ed.). Foye's principle of medicinal chemistry. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters kluwer Health, 2008. p. 26-51.

LAURENT, S. A. L. et al. Synthesis of "Trioxaquantel"[®] derivatives as potential new antischistosomal drugs. European Journal of Organic Chemistry, v. 2008, n. 5, p. 895-913, 2008.

LEE, S. E. et al. Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* J. Microbiol. Biotechnol., v. 12, n. 4, p. 679-682, 2002.

LEITÃO, A. et al. Desenvolvimento de fármacos. In: MONTANARI, C. (Ed.). Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. p. 67-89.

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

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

LILL, M. A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. Drug Discov. Today, v. 12, n. 23-24, p. 1013-1017, 2007.

LIN, Z. et al. Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation. J. Pharm. Pharmacol., v. 59, n. 4, p. 529-536, 2007.

LOPEZ, A. et al. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. J. Nat. Prod., v. 65, n. 1, p. 62-64, 2002.

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

MACHADO E SILVA, J. R. et al. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S. et al. (Ed.). Schistossoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FioCruz, 2008. p. 45-73.

MAGALHAES, L. G. et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitol. Res., v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009.

MARQUES, J. V. Atividade biológica de amidas e análogos de espécies de *Piper* e estudos biossintéticos. 2009. 375 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MCVEIGH, P. et al. Parasite neuropeptide biology: Seeding rational drug target selection? International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 2, p. 76-91, 2012.

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

MITSUI, Y. et al. In vitro effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. Journal of Helminthology, v. 83, n. 1, p. 7-11, 2009.

MORAES, J. Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. 2011. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MORAES, J. et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. Exp. Parasitol., v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011.

MORAES, J. et al. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity and tegumental. Exp. Parasitol., v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012.

MORAES, J. D. Antischistosomal Natural Compounds: Present Challenges for New Drug Screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A. J. (Ed.). Current topics in Tropical Medicine. InTech, 2012. p. 333-358.

MORAES, J. et al. In vitro synergistic interaction between amide pipartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. Curr. Med. Chem., v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013.

NAIKA, R. et al. Antibacterial activity of piperlongumine an alkaloid isolated from methanolic root extract of *Piper Longum* L. Pharmacophore, v. 1, n. 2, p. 141-148, 2010.

NAVICKIENE, H. M. D. et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.

NGONO NGANE, A. et al. Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. Fitoterapia, v. 74, n. 5, p. 464-468, 2003.

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O. S. et al. (Ed.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p.207-244.

PARK, B. S. et al. Antiplatelet activities of newly synthesized derivatives of piperlongumine. Phytother. Res., v. 22, n. 9, p. 1195-1199, 2008.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PATRICK, G. L. Drug design: optimizing target interactions In: _____. (Ed.). An introduction to medicinal chemistry. 4th ed. United States: Oxford University Press Inc., 2009a. p. 212-240.

PATRICK, G. L. Drug discovery: finding a lead. In: _____. (Ed.). An introduction to medicinal chemistry. 4th ed. United States: Oxford University Press Inc., 2009b. p. 187-210.

PATRICK, G. L. Drugs and drug targets: an overview. In: _____. (Ed.). An introduction to medicinal chemistry. 4th ed. United States: Oxford University Press Inc., 2009c. p. 1-13.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. Rev. Bras. Malariol., v. 8, p. 589-591, 1956.

PENIDO, M. L. D. et al. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. Acta Tropica, v. 108, n. 2-3, p. 249-255, 2008.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. International Journal for Parasitology, v. 34, n. 4, p. 527-533, 2004.

PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. Nat. Rev. Drug. Discov., v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.

PRATA, A. L.; COURA, J. R. Fases e formas clínicas da Esquistossomose Mansonii. In: CARVALHO, O. S. et al. (Ed.). Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 739.

PUPO, M. T. et al. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. Química Nova, v. 30, n. 6, 2007.

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

RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress. Nature, v. 475, n. 7355, p. 231-234, 2011.

RAMIREZ, B. et al. Schistosomes: challenges in compound screening. Expert Opinion on Drug Discovery, v. 2, n. s1, p. S53-S61, 2007.

RAO, V. R. et al. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose. Eur. J. Med. Chem., v. 57, p. 344-361, 2012.

RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis control using piplartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 7, n. 6, p. e2251, 2013.

REY, L. Principais grupos de protozoários e metazoários parasitos do homem e seus vetores. In: _____. (Ed.). Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008a. p.136

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

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

REY, L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomíase: a doença. In: _____. (Ed.). Parasitologia - parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008d. p. 447-464

RODRIGUES, R. V. et al. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *piper tuberculatum*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 32, n. 10, p. 1809-1812, 2009.

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

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

SANDERSON, L. et al. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. Journal of Helminthology, v. 76, n. 3, p. 241-247, 2002.

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

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species. Fitoterapia, v. 58, p. 147-165, 1987.

SILVA, F. C. et al. Potencial anti-chagásico de amidas naturais e derivados semisintéticos de *Piper tuberculatum* (Piperaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007. Anais... Águas de Lindóia, SP, 2007.

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

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

SON, D. J. et al. Piperlongumine inhibits atherosclerotic plaque formation and vascular smooth. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 427, n. 2, p. 349-354, 2012.

SOUZA, V. C. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SUN, J. The statistical analysis of interval-censored failure time data. Springer, 2006. 302 p.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose. In: CARVALHO, O. S. et al. (Ed.). Schistossoma mansonii e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FioCruz, 2008. p. 461-478.

TERREAUX, C. et al. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper Dilatatum* in honour of Professor G. H. Neil Towers 75th birthday. Phytochemistry, v. 49, n. 2, p. 461-464, 1998.

TSAI, I. L. et al. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. Planta Medica, v. 71, n. 6, p. 535-542, 2005.

URETSKY, N.; ROBERTSON, L. Academic preparation for modern drug discovery. ScienceCareers.org, 2004. p. 1-3.

VAN HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. International Journal for Parasitology, v. 36, n. 6, p. 691-699, 2006.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansonii*. Nat. Genet., v. 35, n. 2, p. 148-157, 2003.

VISWANADHAN, V. N. et al. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. J. Chem. Inf. Comput. Sci., v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

WANKE, S. et al. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. Immunology and Cell Biology, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.

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

XIAO, S. H.; CATTO, B. A. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. Antimicrob. Agents Chemother., v. 33, n. 9, p. 1557-1562, 1989.

XIAO, S. H. et al. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. Antimicrob. Agents Chemother., v. 51, n. 4, p. 1440-1445, 2007.