



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
MESTRADO**

**Lucas Fukui-Silva, Sophia C. Spoladore, Camila S. Amorim, Marina M.
Gonçalves, João Henrique G. Lago e Josué de Moraes**

**Potencial anti-helmíntico da piplartina isolada de *Piper truncatum* frente ao
nematoide zoonótico *Angiostrongylus cantonensis***

Guarulhos

2025

Resumo:

As infecções causadas por nematoides parasitas, como *Angiostrongylus cantonensis*, continuam a representar um importante desafio à saúde pública global, sobretudo em razão da limitada eficácia de fármacos largamente empregados, como o albendazol. A piplartina, uma amida bioativa isolada de *Piper truncatum* (Piperaceae), foi avaliada quanto à sua atividade antiparasitária, demonstrando efeito significativo sobre larvas de primeiro (L1) e terceiro estágio (L3) do helminto. Os valores de EC₅₀ determinados para a piplartina foram de 8,3 µM (L1) e 10,4 µM (L3), inferiores aos registrados para o albendazol, que apresentou 14,2 µM e 15,6 µM, respectivamente. Ensaio conduzidos com *Caenorhabditis elegans* demonstraram que a piplartina, nas concentrações ativas, não induziu toxicidade, o que sustenta seu perfil de seletividade antiparasitária. As predições *in silico* indicaram propriedades farmacocinéticas compatíveis com aplicação terapêutica, incluindo alta absorção intestinal e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, atributos relevantes para o tratamento de infecções neurotrópicas.

Palavras-chave: Anti-helmíntico; *Angiostrongylus cantonensis*; Piplartina; *Piper truncatum*

Abstract:

Infections caused by parasitic nematodes, such as *Angiostrongylus cantonensis*, continue to represent a significant global public health challenge, particularly due to the limited efficacy of widely used drugs like albendazole. Piplartine, a bioactive amide isolated from *Piper truncatum* (Piperaceae), was evaluated for its antiparasitic activity, demonstrating significant effects against first (L1) and third stage (L3) larvae of the helminth. The EC₅₀ values determined for piplartine were 8.3 µM (L1) and 10.4 µM (L3), lower than those recorded for albendazole, which showed 14.2 µM and 15.6 µM, respectively. Assays conducted with *Caenorhabditis elegans* demonstrated that piplartine, at active concentrations, did not induce toxicity, supporting its selective antiparasitic profile. *In silico* predictions indicate pharmacokinetic properties compatible with therapeutic use, including high intestinal absorption and the ability to cross the blood-brain barrier, attributes relevant for the treatment of neurotropic infections.

Keywords: Anthelmintic; *Angiostrongylus cantonensis*; Piplartine; *Piper truncatum*

Introdução

Nematódeos parasitas representam um sério problema de saúde pública, afetando aproximadamente um bilhão de pessoas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais marcadas por desigualdades socioeconômicas [1]. Dentre esses organismos, *Angiostrongylus cantonensis* tem se destacado como um agente zoonótico emergente [2,3]. Seu ciclo de vida envolve ratos como hospedeiros definitivos e moluscos gastrópodes como hospedeiros intermediários. As larvas de terceiro estágio (L3), após se desenvolverem nos gastrópodes, tornam-se infectantes para mamíferos. Em humanos, atuando como hospedeiros acidentais, essas larvas migram para o sistema nervoso central, ocasionando meningite eosinofílica, condição neurológica grave, potencialmente fatal ou com sequelas permanentes [4].

Apesar da relevância crescente da angiostrongilíase, as opções terapêuticas permanecem limitadas. O albendazol, fármaco amplamente utilizado, apresenta eficácia restrita frente aos estágios larvais de *A. cantonensis* e está associado ao risco de desenvolvimento de resistência [5]. Tal cenário evidencia a necessidade de novos agentes com mecanismos de ação alternativos [6,7].

Compostos naturais têm desempenhado papel central na descoberta de fármacos antiparasitários, como exemplificado pela ivermectina e pela artemisinina [8]. O gênero *Piper*, reconhecido pelo uso tradicional no tratamento de infecções parasitárias, é rico em metabólitos bioativos, entre os quais se destaca a piplartina (piperlongumina) [9]. Este composto, isolado de espécies como *Piper truncatum*, tem demonstrado propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e antiparasitárias [10-14].

Objetivo

Investigar a atividade da piplartina contra as larvas L1 e L3 de *Angiostrongylus cantonensis*, por meio de ensaios *in vitro*, e avaliar seu perfil de toxicidade utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico. Além disso, caracterizar suas propriedades farmacocinéticas por meio de análises *in silico*, com o intuito de verificar seu potencial como agente terapêutico para o tratamento da angiostrongilíase.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Os ramos de *Piper truncatum* foram coletados em Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em setembro de 2020 (código de registro no SISGEN A4123E4). O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Guilherme M. Antar e um exemplar testemunho (Antar 3098) foi depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Extração e Isolamento da Piplartina

Ramos secos e pulverizados de *Piper truncatum* (254 g) foram exaustivamente extraídos com hexano à temperatura ambiente. Após remoção do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 1,5 g de extrato bruto. Parte desse material (1,4 g) foi submetida a uma coluna de gel de sílica, eluída com quantidades crescentes de acetato de etila (EtOAc) em hexano, originando oito frações (A–H). Uma porção do grupo F (150 mg) foi fracionada em cromatografia sobre Sephadex LH-20, eluída com hexano:diclorometano (1:4), diclorometano:acetona (3:2 e 1:4) e acetona 100%, resultando em nove frações (F1–F9). A fração F4 (41 mg) foi purificada por HPLC semi-preparativa em fase reversa C18, eluída com metanol:água (7:3), obtendo-se 35 mg de piplartina pura.

Manutenção de Parasitas e Animais

O ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* (cepa NPDN-AC) foi mantido em condições laboratoriais no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas da Universidade Guarulhos. Os hospedeiros definitivos, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), e os hospedeiros intermediários caramujos de água doce (*Biomphalaria glabrata*) e caramujo gigante africano (*Achatina fulica*) foram alojados em ambiente controlado, com temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de 50 a 60%, dispondo de acesso irrestrito a alimento e água. O nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* (cepa Bristol N2) foi cultivado em placas de ágar contendo meio de crescimento específico para nematoides (NGM), previamente semeadas com *Escherichia coli* OP5047 como fonte de nutrientes [15].

Atividade Antiparasitária Contra Larvas L1 de *A. cantonensis*

Larvas do primeiro estágio (L1) foram coletadas a partir de amostras fecais de ratos Wistar infectados, utilizando o método de sedimentação de Rugai [16]. As larvas foram lavadas três vezes em meio RPMI 1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100

µg/mL de estreptomicina. Aproximadamente 50 larvas L1 foram distribuídas em poços individuais de uma placa de 96 poços contendo 200 µL de meio RPMI, volume final [17]. A piplartina e o albendazol foram dissolvidos em DMSO (concentração final $\leq 0,5\%$) e testados em diluições seriadas a partir de 100 µM. As placas foram incubadas a 21 °C por 24 horas, e a motilidade larval foi avaliada microscopicamente, utilizando um sistema de classificação em quatro níveis: imóvel, intermitente, lenta ou altamente ativa. Um composto foi considerado eficaz quando $\geq 60\%$ das larvas apresentaram imobilidade completa [18].

Atividade Antiparasitária Contra Larvas L3 de *A. cantonensis*

Larvas infectantes do terceiro estágio (L3) foram obtidas a partir de caramujos *Achatina fulica* infectados experimentalmente, por meio da digestão com pepsina-HCl (1% pepsina em 0,7% HCl, 37 °C, 2 horas) [19], seguida da sedimentação pelo método de Rugai [16]. Aproximadamente 50 larvas L3 foram transferidas para cada poço de uma placa de 96 poços contendo meio RPMI 1640. A piplartina e o albendazol foram testados conforme descrito para as larvas L1. A viabilidade larval foi monitorada nos tempos 0 h e 24 h pós-tratamento, utilizando microscópio invertido (100× de aumento). A classificação da motilidade seguiu os mesmos critérios do ensaio com L1.

Avaliação de Seletividade em *C. elegans*

Larvas sincronizadas de *C. elegans* no estágio L4 foram distribuídas em placas de 96 poços contendo tampão M9 (60 larvas/poço). A piplartina foi avaliada em concentrações de até 1000 µM, utilizando o albendazol como controle positivo e DMSO a 0,5% como controle veicular [20]. Após incubação por 24 h a 21 °C, a sobrevivência larval foi determinada com base na motilidade: larvas que não respondiam a estímulos mecânicos leves foram classificadas como inviáveis. A toxicidade foi definida como imobilidade $\geq 60\%$ [21].

Perfil ADME Computacional

As propriedades de *drug-likeness* e farmacocinéticas da piplartina foram previstas utilizando a ferramenta online SwissADME [22]. A estrutura do composto foi desenhada no Marvin JS (ChemAxon), exportada como uma cadeia SMILES e analisada quanto à conformidade com a Regra dos Cinco de Lipinski, aos critérios de biodisponibilidade de Veber e aos alertas de interferência em ensaios (PAINS). Os principais parâmetros

avaliados incluíram a absorção gastrointestinal e a permeabilidade à barreira hematoencefálica.

Análise Estatística

As curvas dose–resposta foram geradas no GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA) utilizando um modelo de regressão logística de quatro parâmetros para calcular os valores de EC₅₀ (atividade antiparasitária) e LD₅₀ (toxicidade) [23]. A significância estatística entre os grupos de tratamento foi determinada por ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Conformidade Ética

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Guarulhos (Protocolo nº 064/24) e conduzidos de acordo com as diretrizes nacionais brasileiras de bem-estar animal (CONCEA).

Desenvolvimento

A atividade anti-helmíntica da piplartina contra *Angiostrongylus cantonensis* foi investigada por meio de ensaios in vitro utilizando larvas de primeiro (L1) e terceiro estágio (L3), obtidas a partir de ratos e moluscos previamente infectados. As larvas foram expostas a diferentes concentrações de piplartina, com albendazol empregado como controle, devido ao seu uso consolidado no tratamento de helmintíases.

Os resultados revelaram que a piplartina apresentou maior eficácia antiparasitária, com valores de EC₅₀ de 8,3 µM para L1 e 10,4 µM para L3, inferiores aos valores obtidos para o albendazol (14,2 µM e 15,6 µM, respectivamente). A redução na viabilidade das larvas mostrou-se dependente da concentração do composto, sendo observada imobilidade quase completa das larvas L1 em concentrações inferiores a 10 µM. Em contrapartida, o albendazol necessitou de doses mais elevadas para alcançar efeitos semelhantes. Para as larvas L3, a curva dose–resposta da piplartina evidenciou um declínio mais acentuado na viabilidade em comparação ao albendazol. Além disso, ambas as larvas expostas a piplartina e albendazol apresentaram alterações morfológicas significativas, especialmente na região caudal, com retração e danos na superfície.

A seletividade da piplartina foi avaliada em larvas L4 de *Caenorhabditis elegans*, utilizadas como organismo modelo para toxicidade. Mesmo quando expostas a concentrações de até 1000 µM, não foram detectados efeitos tóxicos relevantes, indicando um perfil de segurança favorável e alta seletividade.

Complementarmente, as propriedades farmacocinéticas da piplartina foram analisadas por predições *in silico* na plataforma SwissADME. O composto apresentou conformidade com a Regra dos Cinco de Lipinski, além de parâmetros promissores, como alta absorção intestinal e permeabilidade à barreira hematoencefálica. Essas características são essenciais para o desenvolvimento de tratamentos contra infecções neurotrópicas, reforçando o potencial da piplartina como candidata a fármaco

Considerações Finais

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram a atividade anti-helmíntica da piplartina, isolada de *Piper truncatum*, contra o nematoide zoonótico *A. cantonensis*. Os ensaios *in vitro* evidenciaram que a piplartina apresentou eficácia superior à do albendazol e não exibiu toxicidade no modelo com *Caenorhabditis elegans*. Assim, este trabalho identifica a piplartina como um composto anti-helmíntico de origem natural com dupla vantagem, bioatividade já reconhecida na medicina tradicional e validação computacional de propriedades farmacológicas, ressaltando o valor contínuo da etnofarmacologia na descoberta de novos fármacos. Estudos futuros devem priorizar a validação da eficácia *in vivo*, o esclarecimento dos mecanismos de ação e a otimização estrutural visando o avanço da piplartina rumo ao desenvolvimento clínico.

Referências Bibliográficas

- 1 - King, C.H. Helminthiasis Epidemiology and Control: Scoring Successes and Meeting the Remaining Challenges. *Adv. Parasitol.* 2019, 103, 11–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2018.08.001>
- 2 - Griffin, C.D.; Ezenwa, V.O.; Cowie, R.H. Insights into the Biology of the Rat Lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasites Vectors* 2025, 18, 163. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06790-3>
- 3 - Tian, X.; Chen, S.; Duan, L.; Qian, Y.; Li, H.; Lv, S. The Global Spread Pattern of Rat Lungworm Based on Mitochondrial Genetics. *Pathogens* 2023, 12, 788. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12060788>
- 4 - Sohal, R.J.; Gilotra, T.S.; Nguyen, A.D.; Lui, F. *Angiostrongyliasis*; StatPearls: Treasure Island, FL, USA, 2024.
- 5 - Jacob, J.; Steel, A.; Howe, K.; Jarvi, S. Management of Rat Lungworm Disease (Neuroangiostrongyliasis) Using Anthelmintics: Recent Updates and Recommendations. *Pathogens* 2022, 12, 23. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12010023>
- 6 - Mengarda, A.C.; Silva, T.C.; Silva, A.S.; Roquini, D.B.; Fernandes, J.P.S.; de Moraes, J. Toward Anthelmintic Drug Candidates for Toxocariasis: Challenges and Recent Developments. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, 251, 115268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115268>
- 7 - Shang, X.; Dai, L.; Cao, X.; Ma, Y.; Gulnaz, I.; Miao, X.; Li, X.; Yang, X. Natural products in antiparasitic drug discovery: Advances, opportunities and challenges. *Nat. Prod. Rep.* 2025. DOI: <https://doi.org/10.1039/D5NP00007F>
- 8 - Moraes, J.; Lago, J.H.G. Natural Products as Lead Compounds for Treatment of Neglected Tropical Diseases: Dream or Reality? *Future Med. Chem.* 2022, 14, 1607–1609. DOI: <https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0245>
- 9 - Salehi, B.; Zakaria, Z.A.; Gyawali, R.; Ibrahim, S.A.; Rajkovic, J.; Shinwari, Z.K.; Khan, T.; Sharifi-Rad, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules* 2019, 24, 1364. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- 10 - Araújo-Vilges, K.M.; Oliveira, S.V.; Couto, S.C.P.; Fokoue, H.H.; Romero, G.A.S.; Kato, M.J.; Romeiro, L.A.S.; Leite, J.R.S.A.; Kuckelhaus, S.A.S. Effect of Piplartine and Cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on Peritoneal Cells of Swiss Mice. *Pharm. Biol.* 2017, 55, 1601–1607. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1313870>

- 11 - Ticona, J.C.; Bilbao-Ramos, P.; Flores, N.; Dea-Ayuela, M.A.; Bolás-Fernández, F.; Jiménez, I.A.; Bazzocchi, I.L. (E)-Piplartine Isolated from *Piper pseudoarborescens*, a Lead Compound Against Leishmaniasis. *Foods* 2020, 9, 1250. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9091250>
- 12 - Jyothi, D.; Vanathi, P.; Gowri, P.M.; Rao, V.R.S.; Rao, J.M.; Sreedhar, A.S. Diferuloylmethane Augments the Cytotoxic Effects of Piplartine Isolated from *Piper chaba*. *Toxicol. Vitro* 2009, 23, 1085–1091. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.023>
- 13 - Bodiwala, H.S.; Singh, G.; Singh, R.; Dey, C.S.; Sharma, S.S.; Bhutani, K.K.; Singh, I.P. Antileishmanial Amides and Lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *J. Nat. Med.* 2007, 61, 418–421. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0159-2>
- 14 - Prasad, S.; Tyagi, A.K. Historical Spice as a Future Drug: Therapeutic Potential of *Piper longum*. *Curr. Pharm. Des.* 2016, 22, 4151–4159. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666160601103027>
- 15 - Brenner, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974, 77, 71–94. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- 16 - Rugai, E.; Mattos, T.; Brisola, A. Nova Técnica para Isolar Larvas de Nematóides das Fezes—Modificação do Método de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1954, 14, 5–8. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.1954.14.33246>
- 17 - Roquini, D.B.; Silva, G.L.; Ferreira, L.L.G.; Andricopulo, A.D.; Wilairatana, P.; de Moraes, J. Susceptibility of *Angiostrongylus cantonensis* Larvae to Anthelmintic Drugs. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 901459. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.901459>
- 18 - Roquini, D.B.; Lemes, B.L.; Kreutz, A.L.B.; Spoladore, S.C.; Amaro, M.C.; Lopes, F.B.; Fernandes, J.P.S.; de Moraes, J. Antihistamines H1 as Potential Anthelmintic Agents against the Zoonotic Parasite *Angiostrongylus cantonensis*. *ACS Omega* 2024, 9, 31159–31165. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04773>
- 19 - da Mota, D.J.G.; de Melo, L.C.V.; Pereira-Chiocola, V.L.; Gava, R.; Pinto, P.L.S. First Record of Natural Infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in *Belocaulus willibaldoi* and *Rattus norvegicus* in an Urban Area of São Paulo City, SP, Brazil. *Heliyon* 2020, 6, e05150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05150>
- 20 - Souza, D.C.S.; Totini, C.H.; Cajás, R.A.; Teixeira, T.R.; Oliveira, E.A.; Cirino, M.E.; Souza, M.C.; Salvadori, M.C.; Teixeira, F.S.; de Moraes, J.; et al. In Vivo

Antischistosomal Efficacy of *Porcelia ponderosa* γ -Lactones. *Phytomedicine* 2024, 135, 156045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.156045>

21 - Cirino, M.E.; Teixeira, T.R.; Silva, A.M.H.; Borges, A.C.C.; Fukui-Silva, L.; Wagner, L.G.; Fernandes, C.; McCann, M.; Santos, A.L.S.; de Moraes, J. Anthelmintic Activity of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Metallodrugs. *Sci. Rep.* 2025, 15, 4699. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88484-5>

22 - Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* 2017, 7, 42717. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42717>

23 - Xavier, R.P.; Mengarda, A.C.; Silva, M.P.; Roquini, D.B.; Salvadori, M.C.; Teixeira, F.S.; Pinto, P.L.; Morais, T.R.; Ferreira, L.L.G.; Andricopulo, A.D.; et al. H1-antihistamines as antischistosomal drugs: In vitro and in vivo studies. *Parasites Vectors* 2020, 13, 278. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04140-z>