

Pesquisa Acadêmica

**Efeito antiparasitário da Amida Piplartina em vermes de *Schistosoma
mansoni***

AUTORES:

CRISTIANE SILVA MORAIS

UNIVERSIDADE GUARULHOS - UNG

ANA CAROLINA MENGARDA

UNIVERSIDADE GUARULHOS - UNG

RAMON MARTINS COGO

UNIVERSIDADE GUARULHOS - UNG

THIAGO RAHAL MORAIS

UNIVERSIDADE GUARULHOS- UNG

ORIENTADOR:

JOSUÉ DE MORAES

UNIVERSIDADE GUARULHOS - UNG

moraesnpdn@gmail.com

**NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS -
NPDN**

Efeito antiparasitário da Amida Piplartina em vermes de *Schistosoma mansoni*

1. RESUMO

As doenças causadas por helmintos representam um importante problema para a saúde pública em diversos países. Dentre essas doenças destaca-se a esquistossomose, onde as questões sócio-ambientais condicionadas a falta de saneamento básico adequado contribuem para a manutenção e propagação do ciclo do parasita, o *S. mansoni*. O tratamento da doença causada por este parasita é baseado apenas em um fármaco, o praziquantel, e considerando a realidade de resistência do parasita ao medicamento uma alternativa está na exploração de recursos naturais, mais especificamente na prospecção de espécies vegetais oriundas da mata atlântica que apresentem potencial bioativo frente ao *S. mansoni*. Neste estudo apresentamos o efeito esquistossomicida da piplartina, uma amida encontrada em plantas do gênero Piper (*Piperaceae*), na qual foram observados em testes *in vivo* uma redução significativa na carga parasitaria e ovos, além de diminuição da manifestação de hepatoesplenomegalia em ambos os grupos tratados com dose única de 400mg/kg e dose diária de 100mg/kg.

PALAVRAS-CHAVE: Antiparasitário; Planta; Amida Piplartina; *Schistosoma mansoni*.

2. Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, devido a sua alta taxa de mortalidade é considerada como um importante problema de saúde pública em diversos países, causando cerca de 500 mil mortes anualmente. Estima-se que 207 milhões de indivíduos encontram-se infectados e 779 milhões vivem em áreas susceptíveis a contrair a infecção (Steinmann *et al.*, 2006). Dentre as três espécies infectantes do homem, avaliaremos a *S. mansoni*, caracterizando-se por sua colonização nas veias porta hepática (Gryseels *et al.*, 2006). Essa espécie é prevalente nos países como: África subsaariana, Brasil, ilhas do Caribe, Porto Rico, Suriname e Venezuela (Kurup *et al.*, 2010).

Esta doença é causada pelo parasita do gênero *Schistosoma*, sendo que este parasita da espécie *S. mansoni* possui uma biologia muito interessante, pois passa por diversas fases e vive em hospedeiros e ambientes diversificados, com uma grande capacidade de adaptação, multiplicação e resistência.

A droga utilizada no tratamento da esquistossomose é o fármaco Praziquantel, um antiparasitário altamente eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* (Hagan *et al.*, 2004). Mas em virtude da sua utilização em larga-escala a questão do surgimento de cepas droga-resistentes tem sido motivo de preocupação entre os cientistas (Katz *et al.*, 1973, Dias *et al.*, 1978, Cioli *et al.*, 1995). O uso de plantas medicinais para o uso terapêutico tem se tornado cada vez mais comum, isso se dá por meio do crescente estudo acerca dessas plantas, contribuindo nas descobertas de suas propriedades terapêuticas e para produção de novos fármacos (Teske *et al.*, 1995). Através de pesquisas Mendelsohn & Balick contabilizaram 375 plantas de importância química terapêutica em florestas de todo o mundo. (Mendelsohn & Balick, 1995)

Tendo em vista a grande quantidade de plantas disponíveis a serem estudadas, autores ao longo dos anos vem discutindo sobre a importância de plantas medicinais como uma potencial alternativa terapêutica (Cordell *et al.*, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, planta medicinal é "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos" (WHO, 1998).

No presente trabalho avaliaremos através de testes *in vivo* o efeito esquistossomicida da pipartina, uma amida encontrada em plantas do gênero Piper (Parmar *et al.*, 1997). Essa substância em avaliações *in vitro* ou *in vivo* demonstra ter inúmeras atividades biológicas, dentre elas: efeito antiplaquetário, antidepressivo, anti-inflamatório, antitumoral, ansiolítico (Bezerra *et al.*, 2005; 2006, 2008; Cícero Bezerra Felipe *et al.*, 2007; Fontenele *et al.*, 2009).

Nos ensaios *in vivo* realizados observamos que os grupos submetidos a ação da pipartina comparados ao grupo controle positivo, houve a redução significativa da carga parasitária, ovos por grama de fezes (OPG), hepato e esplenomegalia em grupos tratados com dose única de 400mg/kg e dose diária de 100mg/kg.

Após feito os testes avaliativos, observou-se uma ligeira eficácia terapêutica com o uso do composto natural amida pipartina foi superior ao do praziquantel, demonstrando que a pipartina poderia ser utilizada como um tratamento potencial para a doença esquistossomose.

3. Objetivo

- Avaliar o efeito antiparasitário *in vivo* da raiz Amida Pipartina em vermes de *Schistosoma mansoni*.

4. Comitê de Ética

Os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira (11790/2008). O protocolo de manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da CEUA e recebeu o protocolo no. 05/2015.

4.1. Metodologia

O teste anti-esquistossomicas *in vivo* foi realizado em camundongos swiss fêmeas com três semanas de vida, infectados com 70 cercarias de *S. mansoni* injetados

subcutaneamente, seguindo os procedimentos operacionais de quimioterapia operacional para drogas anti-esquistossomias.

Os camundongos foram mantidos com acesso a água e ração durante todo o processo experimental, o composto natural amida piplartina foi extraído com MeOH (2 x 2l) à temperatura ambiente durante três dias a partir de inflorescências de *P. tuberculatum* (500 g). As soluções foram filtradas e concentradas sob condições de vácuo, produzindo xarope escuro (47 g). Parte deste extrato (2 g) foi submetido a uma coluna de cromatografia em sílica gradiente de hexano-EtOAc em polaridades crescentes, o que produziu 35 frações. A fração 20 (350 mg) foi recristalizada com MeOH; Obteve-se um composto branco cristalino (150 mg). Análise de RMN de ^1H de acordo aos dados publicados (Navickiene *et al.*, 2000).

Após a obtenção da piplartina, 4 grupos experimentais foram submetidos ao tratamento, dois grupos com dose única de 400mg/kg e dois grupos com dose diária de 100mg/kg ambos com vermes na fase adulta e juvenil. No grupo controle positivo foi administrado praziquantel e no grupo controle negativo foi administrado salina.

Após o período de tratamento os camundongos foram eutanasiados com CO_2 e dissecados 56 dias após a infecção. Os vermes foram coletados, sexados e contados. A avaliação de eficácia terapêutica foi baseada na técnica de oograma qualitativos e quantitativos usando um fragmento de (10mm) do cólon ascendente e o método Kato-Katz para avaliar a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG). Os grupos que foram tratados com o composto natural e os grupos controles positivo e negativo foram comparados utilizando o teste de comparação múltipla de Dunnett paramétrico onde a significância estatística foi definida como $<0,05$ no software GraphPad Prism.

5. Resultados

Após realizado o teste *in vivo* com vermes na fase juvenil e adulto, os camundongos submetidos ao tratamento com a amida piplartina, sendo eles dois grupos de dose única de 400mg/kg e dois de dose diária de 100mg/kg, após serem eutanasiados foi feita a avaliação terapêutica, foram avaliados a carga parasitária, ovos por gramas de fezes e ovos imaturos.

Como comparativo utilizamos o grupo controle positivo ao qual foi administrado o fármaco praziquantel, o grupo de dose única em que os vermes se encontravam na fase adulta houve redução de 71.1% na carga parasitária, no ovos por grama de fezes (OPG) a redução foi de 76.8% e ovos imaturos houve diminuição de 72.4%.

O grupo de dose diária com vermes na fase adulta, observamos a redução de 55% na carga parasitária, ovos por grama de fezes (OPG) 69.9% e ovos imaturos 74.6%. Na fase juvenil do mesmo grupo, notamos a redução de 58.7% de carga parasitária, ovos por grama de fezes (OPG) 50.1% e ovos imaturos 41.4%.

Para o Grupo de dose única com vermes juvenis houve redução de 54,1% na carga parasitária, ovos por grama de fezes (OPG) 52.7% e ovos imaturo 48.7%, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Comparação das reduções de Carga Parasitária, Ovos Imaturos e Ovos Por Grama (OPG) de fezes entre os grupos tratados com piplartina e o fármaco padrão.

Fármaco	Dose oral (mg/kg)	<i>S. mansoni</i> adulto			<i>S. mansoni</i> juvenil		
		Carga Parasitária	Ovos Imaturos	OPG	Carga Parasitária	Ovos Imaturos	OPG
Praziquantel	400	~90%	~90%	~90%	~25%	~25%	~25%
Amida Piplartina	400	71.1%	72.4%	76.8%	54.1%	48.7%	52.7%
	5 x 100	55.0%	74.6%	69.9%	58.7%	41.4%	50.1%

6. Considerações finais

Mesmo se tratando de um problema de saúde pública e sendo considerada como uma doença negligenciada o tratamento da esquistossomose é feito com um único fármaco, o praziquantel, e por se tratar de uma doença parasitária a indústria farmacêutica não demonstra interesse em produzir novos fármacos.

Desta forma, a busca por metabólitos bioativos com potencial esquistossomicida é uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas terapias destinadas a esta doença, visto que muitos pesquisadores vêm discutindo sobre a importância do uso de plantas medicinais como uma potencial fonte de novos medicamentos que ainda necessitam de mais estudos.

Neste estudo foi realizado o tratamento experimental da esquistossomose, utilizando-se a amida piplartina, um composto natural pertencente a família *Piperaceae*. Em estudos *in vitro* realizados anteriormente, os vermes submetidos a ação deste composto foi observado a redução de 75% na oviposição, demonstrando também que a piplartina teve uma ótima atividade em vermes na fase adulta, sem diferencial de sensibilidade entre vermes machos e fêmeas (Moraes *et al.*, 2011). Constatando que a piplartina é tóxica em altas doses, mas em doses subletais interfere significativamente na reprodução dos vermes de *Schistosoma mansoni* (Moraes *et al.*, 2011).

Por meio de análises microscópicas foram identificados danos à superfície provocando sua ruptura, assim como o colapso dos tubérculos e alteração morfológica em suas vias orais.¹² Esses mesmos danos tegumentares também foram relatados em vermes que foram submetidos à ação do Praziquantel (William *et al.*, 2001).

A ação anti-helmíntica da amida piplartina ainda não foi descrita, mas através dos testes *in vitro* e *in vivo* sabe-se que o composto age principalmente na atividade motora do verme, do que na destruição do tegumento. Pois, para atingir significativamente o tegumento é necessário doses altas letais, do que para promover a paralisia dos vermes e logo em seguida a sua morte (Moraes *et al.*, 2011).

7. Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Ana Carolina Mengarda é bolsista de Mestrado da coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Poliana Mendonça é bolsista de Mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Josué de Moraes é bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPQ.

8. Referências Bibliográficas

1. Steinmann, Peter, et al. "Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk." *The Lancet infectious diseases* **2006**, 6.7, 411-425;
2. Steinmann, Peter, et al. "Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk." *The Lancet infectious diseases* **2006**, 6.7, 411-425;
3. Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet* **2006**, 368, 1106–1118;
4. Kurup, Rajini, and Gurdip S. Hunjan. "Epidemiology and control of Schistosomiasis and other intestinal parasitic infections among school children in three rural villages of south Saint Lucia." *Journal of Vector Borne Diseases* **2010**, 47.4, 228;
5. Hagan, Paul, et al. "Schistosomiasis control: keep taking the tablets." *Trends in parasitology* **2004**, 20.2, 92-97;
6. Katz, Naftale, et al. "Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1973**, 7.6, 381-387;
7. Teske, M.; Trentini, A. M. M.; *Compêndio de Fitoterapia*, 2a. ed., *Herbarium Lab. Botânico, Curitiba, Paraná*, **1995**;
8. Mendelsohn, Robert, and Michael J. Balick. "The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests." *Economic Botany* **1995**, 49.2 223-228;
9. Cordell, Geoffrey A., Mary Lou Quinn-Beattie, and Norman R. Farnsworth. "The potential of alkaloids in drug discovery." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **2001**, 15.3, 183-205;
10. Parmar, Virinder S., et al. "Phytochemistry of the genus *Piper*." *Phytochemistry* **1997**, 46.4, 597-673.
11. World Health Organization. "The World Health Report 1998: *Life in the 21st century a vision for all*." **1998**;
12. Bezerra, D. P. "Potencial anticâncer da pipartina e piperina, amidas isoladas de plantas do gênero *Piper*" 140 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza **200**;

13. Bezerra, Daniel Pereira, et al. "Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species." *Zeitschrift für Naturforschung C* **2005** 60.7-8, 539-543;
14. Bezerra, D. P., et al. "In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper." *Brazilian journal of medical and biological research* **2006**, 39.6, 801-807;
15. Bezerra, Daniel P., et al. "In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* **2008**, 28.2, 156-163;
16. Navickiene, Hosana Maria D., et al. "Antifungal amides from Piper hispidum and Piper tuberculatum." *Phytochemistry* **2000**, 55.6, 621-626;
17. Moraes, Josué, et al. "Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of piplartine." *Experimental Parasitology* **2011**, 127.2, 357-364;
18. William, S., Botros, S., Ismail, M., Farghally, A., Day, T.A., Bennett, J.L.,. "Praziquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections". *Parasitology* **2001**, 122, 63-66.