



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado



**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E *in vivo* DO
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora edulis* Sims
ASSOCIADO OU NÃO AO PRAZIQUANTEL**

GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES FRAZÃO

São Luís
2021

GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES FRAZÃO

**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E *in vivo* DO
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora edulis* Sims
ASSOCIADO OU NÃO AO PRAZIQUANTEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Flavia Maria Mendonça do Amaral.

São Luís
2021

Frazão, Gleycka Cristine Carvalho Gomes.

EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA in vitro E in vivo DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora edulis* Sims ASSOCIADO OU NÃO AO PRAZIQUANTEL / Gleycka Cristine Carvalho Gomes Frazão. - 2021.

83 f.

Coorientador(a): Flavia Maria Mendonça do Amaral.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Citotoxicidade. 2. Esquistossomose. 3. Histopatologia. 4. Maracujá. 5. Parasitológico. I. Amaral, Flavia Maria Mendonça do. II. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. III. Título.

GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES FRAZÃO

**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* E *in vivo* DO
EXTRATO DAS FOLHAS DE *Passiflora edulis* Sims
ASSOCIADO OU NÃO AO PRAZIQUANTEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Flavia Maria Mendonça do Amaral (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Johnny Ramos do Nascimento (1º Examinador)
Unidade de Ensino Superior Dom Bosco

Prof Dr. Hermes Ribeiro Luz (2º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho (3º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.
Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.
Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...
Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.
Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.
"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

À minha família, por ser meu incentivo, força, apoio e
motivação a cada dia.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir viver e me fortalecer a cada dia.

À minha família, em especial aos meus pais Valdirene e Edilson, ao meu marido Orlando, à minha filha Isis, e à minha irmã Edilene, pelo amor, cuidado, força e incentivo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, por ser minha inspiração profissional, só tenho gratidão, respeito e amor. Obrigada por ter me acolhido, por me incentivar e me tranquilizar em meio as minhas ansiedades e angustias.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Flavia Maria Mendonça do Amaral, que me possibilitou voltar a vida acadêmica, por quem tenho grande carinho e respeito. Muito obrigada pelo voto de confiança e credibilidade durante esses dois anos.

À Prof^a Dr^a Lucilene Silva (“Profa Luh”), obrigada pelo imenso apoio e carinho desde o início do mestrado e nas análises histológicas.

À Prof^a Dr^a Rosane Guerra, a quem sou imensamente grata por todo carinho, disponibilidade e incentivo na realização da pesquisa!

Ao Prof. Dr. Rafael Carvalho, pelo carinho, companheirismo, pelas ideias e contribuições.

Aos Profs. Drs. Mayara, Thiare Fortes e Paulo Vitor, por serem fonte de inspiração e incentivo e por sempre estarem dispostos a ajudar!

Aos meus amigos Gustavo e Guilherme, por toda ajuda, nem sei o que seria de mim sem vocês me acolhendo, apoiando, e me incentivando a nunca desistir. Amo e admiro vocês demais! Obrigada 1 milhão de vezes.

Aos meus irmãos científicos Irrla, Gabi, Rani e Vitor, por toda ajuda, desespero, risos, brigas e crises compartilhadas, com vocês tudo fica mais divertidos e leve!

A todos que fazem parte da família do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da UFMA pelo grande apoio sempre! Em especial a Regis, Mirtes, Sulayne, Jefferson, Carol e André pela parceria, pelos dias e noites em que me fizeram companhia nos experimentos e por toda dedicação me ajudando no que fosse preciso!

À Prof^a Dr^a Claudia Rocha e Ludmila Mesquita, pelo suporte no preparo e caracterização química do extrato e por toda a disponibilidade.

Às minhas amadinhas Camila, Lays, Nathaly, Priscilla e Rayana, obrigada por serem presentes até na distância. Amo vocês!

Aos amigos que ganhei nessa jornada Tassio e Paula ♥.

Aos meus companheiros de turma, pela parceria, amizade e ajuda nos momentos difíceis e horas de estudos compartilhados.

Ao CNPq e Fapema pela bolsa recebida e financiamento.

E a todos que me ajudaram a chegar até aqui! Obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Esquistossomose mansônica.....	4
2.1.1 Ecoepidemiologia.....	4
2.1.2 Ciclo biológico	8
2.1.3 Diagnóstico	10
2.1.4 Controle da esquistossomose	11
2.2 O Gênero <i>Passiflora</i>	13
2.2.1 <i>Passiflora edulis</i> Sims	14
2.3 Espécies vegetais na Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novas opções terapêuticas: estudo de validação	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica.....	21
4.2 Obtenção do extrato de <i>P. edulis</i>	21
4.3 Ensaios de citotoxicidade	21
4.3.1 Citotoxicidade utilizando célula de linhagem GM-07492.....	21
4.3.2 Atividade hemolítica	23
4.4 Caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	23
4.5 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	24
4.5.1 Critérios de avaliação esquistossomicida e cálculo de CI ₅₀	24
4.6 Avaliação da oviposição <i>in vitro</i> de <i>S. mansoni</i>	25
4.7 Avaliação do efeito esquistossomicida <i>in vivo</i>.....	25
4.7.1 Animais	25
4.7.2 Obtenção das cercárias	25
4.7.3 Infecção dos camundongos.....	26
4.7.4 Eutanásia dos camundongos	27
4.7.5 Quantificação de ovos eliminado nas fezes.....	28
4.7.6 Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos nos tecidos	28

4.8 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático	29
4.9 Análises dos resultados	29
5 RESULTADOS	31
5.1 EPE não apresenta citotoxicidade <i>in vitro</i>	31
5.2 O EPE apresenta atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	32
5.3 EPE reduz a oviposição fêmeas de <i>S. mansoni</i> tratadas <i>in vitro</i>	34
5.4 EPE apresenta efeito esquistossomicida <i>in vivo</i>	34
5.4.1 EPE reduz ovos nas fezes	34
5.4.2 EPE reduz ovos nos tecidos.....	35
5.5 EPE reduz a quantidade de ovos e a área dos granulomas.....	37
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

LISTA DE ABREVIACÕES

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CAA** – Antígenos Anódicos Circulantes
- CCA** – Antígenos Catódicos Circulantes
- CEUA** – Comitê de Ética para o Uso de Animais
- CI** – Concentração Inibitória
- CI₅₀** – 50% de Concentração Inibitória média
- CNS** – Conselho Nacional de Saúde
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DL₅₀** – Dose Letal mediana
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DO** – Densidade Óptica
- EPE** – Extrato *Passiflora edulis*
- GBD** – Carga Global de Doenças, do inglês *Global Burden of Disease*
- GIDE** – Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose
- HPJ** – Método de sedimentação espontânea
- IC** – Intervalo de confiança
- KOH** – Hidróxido de potássio
- MIFC** – Método de Centrífugo-sedimentação
- NaCl** – Cloreto de sódio
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- OPG** – Ovos por grama de fezes
- P&D** – Pesquisa e Desenvolvimento
- PBS** – Salina Tamponada com Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
- PBS** – Tampão fosfato de sódio
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- PZQ** – Praziquantel
- RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada
- RENISUS** – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

RPMI – Meio de Cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

VSPs – Proteínas de Superfície Variantes

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de algumas espécies de <i>Schistosoma</i> capazes de infectar humanos	04
Figura 2. Distribuição geográfica de esquistossomose no Brasil segundo a média do percentual de positividade por município	06
Figura 3. Mapa densidade de casos de esquistossomose por município no estado do Maranhão 2007 a 2016	07
Figura 4. Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i>	08
Figura 5. Flor (A), folha (B) e frutos (C; D) de <i>Passiflora edulis</i> Sims	14
Figura 6. Fases da Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de medicamentos a partir de espécies vegetais	18
Figura 7. Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos	27
Figura 8. Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos.....	28
Figura 9. Efeito do extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> em células humanas GM-0754 após 48 h de incubação	31
Figura 10. Efeito do extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> em células humanas GM-0754 após 72 h de incubação	31
Figura 11. Efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> na atividade hemolítica dos eritrócitos de carneiro	32
Figura 12. Viabilidade de vermes machos adultos de <i>S. mansoni</i> (Cepa LE–Belo Horizonte/MG) durante 72 horas de exposição ao extrato hidroetanólico de <i>P. edulis</i>	33
Figura 13. Análise de oviposição de vermes de <i>S. mansoni</i>	34
Figura 14. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> sobre o número de ovos presentes nas fezes (A, B) de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	35

Figura 15. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. Edulis</i> sobre o número de ovos presentes no retidos no fígado (A) e intestino (B) de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	36
Figura 16. Análise morfométricas da área (A) e número (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroetanólico de <i>P. edulis</i> e sua associação ao Praziquantel	38
Figura 17. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroetanólico de <i>P. edulis</i> e sua associação ao Praziquantel corados com HE (100x)	39

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1. Caracterização e descrição dos grupos controles e testes, e os seus respectivos tratamentos	26
Tabela 1. Valores das concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> capazes de inibir 50% a viabilidade dos vermes machos de <i>S. mansoni</i> em diferentes horas	33
Tabela 2. Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroetanólico das folhas de <i>P. edulis</i> (EPE) e sua associação com Praziquantel (EPE+PZQ)	37

RESUMO

No mundo cerca de 240 milhões de pessoas estão infectadas pelo helminto *Schistosoma mansoni*, representando sério problema de saúde pública. Considerada doença negligenciada, a terapêutica da esquistossomose é limitada, com Praziquantel (PZQ), mas efeitos colaterais e resistência parasitária já tem sido relatado. Este quadro torna necessária a Pesquisa e Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos alternativos e/ou complementares. Neste sentido, os produtos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importantes fontes de compostos bioativos, passíveis de ocasionarem efeitos sinérgicos com o Praziquantel. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia e segurança do extrato das folhas de *Passiflora edulis* Sims. (nome vernacular: maracujá) como alternativa e/ou complemento terapêutico ao praziquantel no controle da esquistossomose mansoni experimental. Folhas de *P. edulis* foram coletadas em áreas de cultivo, em Paço Lumiar, Maranhão, Brasil; submetidas a extração padronizada por maceração em 70% etanol no hidromódulo 1:8. Inicialmente foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade (células linhagem GM-0754 e atividade hemolítica) e de eficácia (avaliação esquistossomicida sobre a viabilidade de vermes adultos e inibição da oviposição) com extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* (EPE) em diferentes concentrações. Posteriormente, foram realizados ensaios *in vivo*, empregando camundongos Swiss, divididos em 05 grupos (n: 06 animais/grupo): controle sadio (animais não infectados e nem tratados); controle negativo (animais infectados sem tratamento); controle positivo (animais infectados tratados com PZQ 50mg/Kg), grupo EPE (animais infectados tratados com extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* 50mg/Kg) e grupo EPE+PZQ (animais infectados tratados com extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* 50mg/Kg em associação ao Praziquantel 50mg/Kg); sendo os animais infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 0, tratados do 45 ao 51º dia após a infecção de eutanasiados no 90º dia pós-infecção. Os resultados não evidenciaram citotoxicidade em nenhuma dose testada de EPE. O EPE apresentou atividade esquistossomicida e inibição da oviposição significativa nos testes *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, o EPE reduziu o número de ovos nas fezes bem como os retidos nos tecidos hepático e intestinal. O EPE também reduziu a extensão dos granulomas hepáticos. Este efeito foi potencializado quando o EPE foi associado ao PZQ. Com base nos dados obtidos pode-se concluir que o EPE tanto quando usado isoladamente quanto em associação com PZQ possui efeito antiesquistossomicida contribuindo para a diminuição da eliminação de ovos nas fezes e assim, diminuição da disseminação da doença.

Palavras-chave: Esquistossomose; Maracujá; Citotoxicidade; Parasitológico; Histopatologia.

ABSTRACT

Around 240 million people worldwide are infected by the helminth *Schistosoma mansoni*, representing a serious public health problem. Considered a neglected disease, the treatment of schistosomiasis is limited, with Praziquantel (PZQ), but side effects and parasite resistance have already been reported. This picture makes Research and Development of new alternative and/or complementary therapeutic agents necessary. In this sense, natural products, especially those of plant origin represent important sources of bioactive compounds, likely to cause synergistic effects with Praziquantel. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy and safety of *Passiflora edulis* Sims. (vernacular name: passion fruit) as an alternative and/or therapeutic complement to praziquantel in the control of experimental schistosomiasis mansoni. *P. edulis* leaves were collected from cultivated areas, in Paço Lumiar, Maranhão, Brazil; submitted to standardized extraction by maceration in 70% ethanol in 1:8 hydromodule. Initially, *in vitro* tests of cytotoxicity (GM-0754 cell line and hemolytic activity) and efficacy (schistosomicide evaluation on adult worms viability and inhibition of oviposition) were performed with hydroethanolic extract of *P. edulis* leaves (EPE) at different concentrations. Subsequently, *in vivo* assays were performed using Swiss mice, divided into 05 groups (n: 06 animals/group): healthy control (non-infected and untreated animals); negative control (infected animals without treatment); positive control (infected animals treated with PZQ 50mg/Kg), EPE group (infected animals treated with hydroethanolic extract of *P. edulis* 50mg/Kg) and EPE+PZQ group (infected animals treated with hydroethanolic extract of *P. edulis* leaves 50mg/Kg in association with Praziquantel 50mg/Kg); the animals were infected with 50 cercariae of *S. mansoni* on day 0, treated from day 45 to 51 after infection and euthanized on day 90 post-infection. The results showed no cytotoxic at any tested dose of EPE. EPE showed significant schistosomicidal activity and oviposition inhibition in *in vitro* tests. In the *in vivo* assays EPE reduced the number of eggs in feces as well as those retained in liver and intestinal tissues. EPE also reduced the extent of liver granulomas. This effect was enhanced when EPE was associated with PQZ. Based on the data obtained, it can be concluded that EPE, both when used alone and in association with PZQ, has an antischistosomicidal effect, contributing to a decrease in the elimination of eggs in the feces and thus reducing the spread of the disease.

Keywords: Schistosomiasis; Passionflower; Toxicity; Parasitology; Histopathology

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni é uma doença infecto-parasitária de substancial relevância no panorama de saúde pública mundial, considerada como doença tropical negligenciada em 78 países. Ocasionalmente pelo helminto trematódeo *Schistosoma mansoni*, a doença acomete cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, levando a óbito cerca de 6,4 milhões, perdendo apenas para a malária como a principal causadora de morbidade entre as demais doenças parasitárias (WHO, 2014; WHO, 2017; WHO, 2018; VERJEE, 2019).

No Brasil, estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas sob risco de contrair a doença, devido a extrema pobreza e saneamento básico precário, fatores ligados à presença do hospedeiro intermediário da espécie endêmica *S. mansoni*, representado por caramujos do gênero *Biomphalaria* (SCHOLTE et al., 2014; WHO, 2018). Os casos de esquistossomose no país ocorrem principalmente na faixa litorânea do estado do Maranhão até o Espírito Santo e o estado de Minas Gerais, onde ainda se encontram regiões com prevalência igual ou superior a 15% (NOYA et al., 2015).

A contaminação da esquistossomose mansônica ocorre pela presença dos seus hospedeiros; com ciclo heteroxênico, envolvendo dois seres distintos e ambientes diferentes, sendo o hospedeiro intermediário vivente de ambiente dulcícolas, como algumas espécies de moluscos de gênero *Biomphalaria*, que contaminados atuam na produção contínua de larvas denominadas como cercárias, sendo infectantes para o hospedeiro definitivo, que incluem mamíferos vertebrados, tais como o homem, sendo este o hospedeiro clássico definitivo (MIRANDA et al., 2015; SIMOES et al., 2017; MORAES et al., 2019).

A quimioterapia é uma estratégia geral para o controle da esquistossomose, entretanto, o único fármaco utilizado atualmente para esse fim é o Praziquantel®, que é eficaz sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, porém não altera as lesões histopatológicas já instaladas, as quais podem deixar sequelas irreversíveis (MORAES et al., 2011). Diante dessa problemática, é necessário Pesquisa & Desenvolvimento (P & D) visando novas alternativas e/ou complementos terapêuticos no combate a infecção (LEITE et al., 2017).

No processo de descoberta e desenvolvimento de compostos farmacologicamente ativos, os recursos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importante fonte de drogas. A rica diversidade ecossistêmica do planeta e flora cientificamente desconhecida, associada aos avanços dos estudos químicos e farmacológicos, têm estimulado a pesquisa com espécies vegetais com potencial terapêutico, principalmente as de uso popular tradicional, contribuindo efetivamente para obtenção de novos produtos bioativos, medicamentos semissintéticos ou como protótipo para síntese de moléculas mais ativas e/ou seletivas (MARTINS; GARLET, 2016).

A validação de espécies vegetais visa à comprovação da segurança (ausência de efeitos tóxicos e inexistência de contaminantes nocivos à saúde), eficácia (comprovação dos efeitos terapêuticos) e qualidade (obediência ao conjunto de critérios que caracterizam o material vegetal para o uso ao qual se destina); o que exige o atendimento a determinações legais vigentes como qualquer outro medicamento (BRASIL. Resolução CNS-MS nº 196/96; BRASIL. Resolução ANVISA-MS nº 899/03) e determinações legais específicas (BRASIL. Resolução ANVISA-MS nº 48/04; BRASIL. Decreto nº 5813/06; BRASIL. Resolução RDC ANVISA-MS nº 14/2010; BRASIL. Resolução RDC ANVISA-MS nº 26/2014).

O gênero *Passiflora* é o de maior número de espécies descritas com cerca de 520; sendo destaque no Brasil pela diversidade, com 83 espécies endêmicas dentre 150 espécies nativas (BERNACCI et al., 2015). As espécies de *Passiflora* são conhecidas popularmente como maracujazeiros, ocorrendo variações de acordo com a espécie (MESQUITA, 2019). O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá detendo cerca de 70% da produção mundial (FALEIRO et al., 2005; COELHO et al., 2011), e devido ao seu crescente uso terapêutico e suas atividades comprovadas, a espécie *P. edulis* Sims está incluída oficialmente na bibliografia da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2019).

A composição química das folhas de *P. edulis* tem sido muito estudada, evidenciando a presença de alcaloides, flavonoides e triterpenos (COSTA, 2016). Na prática popular é utilizado como sedativo, cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatório e antihipertensivo (SOUZA, 2016; BRASIL, 2016).

Considerando a elevada prevalência de esquistossomose e comprovação da resistência do parasito aos esquemas terapêuticos usuais, logo com necessidade de pesquisa e desenvolvimento (P & D) de novas opções terapêuticas, especialmente na perspectiva de contribuição efetiva na implantação da Fitoterapia na Assistência à Saúde com os estudos de validação de espécies vegetais da flora brasileira, com destaque a espécies do gênero *Passiflora*; esse projeto propõe a continuidade dos estudos do Grupo de Produtos Naturais e do Grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), com espécies vegetais nativas da flora brasileira e de grande ocorrência no estado do Maranhão, com potencial terapêutico.

Estudos antiesquistossomótico realizados por Rodrigues et al (2020), utilizando a espécie *Dysphania ambrosioides* demonstrou a redução significativa de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes e retidos no tecido hepático, infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose e congestão vascular em animais tratados com *D. ambrosioides*, cuja espécie possui potencial anti-inflamatório (PEREIRA et al., 2010) comprovado. Sabendo que *Passiflora edulis* também possui efeito anti-inflamatório (SILVA, et al, 2001) e estudos anteriores já demonstraram algumas atividades biológicas importantes dessa espécie vegetal, como atividade giardicida (Neiva et al., 2014) e anti-helmíntico (SANGEETHA et al., 2010). Entretanto não há relatos de estudos esquistossomicida utilizando extrato de *P. edulis*.

Diante disso o objetivo do estudo é investigar a eficácia e segurança do extrato das folhas de *P. edulis* no controle de *S. mansoni* como alternativa ou complemento terapêutico ao Praziquantel.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Esquistossomose mansônica

2.1.1 Ecoepidemiologia

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária, negligenciada, ocasionada por trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, com elevado interesse clínico e socioeconômico (MARTINS-MELO, 2014; WHO, 2015; AMARAL et al., 2017; WHO, 2020).

Dentre as espécies responsáveis pela infecção, seis possuem relevância por afetar o ser humano, conhecidas como *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma haematobium* Bilhartz 1852, *Schistosoma mekongi* Voge, Brickner & Bruce 1978, *Schistosoma intercalatum* Fischer 1934 e *Schistosoma guineenses*, distribuídas em regiões geográficas distintas no mundo (Figura 1), pertencentes ao filo Platyhelminthes Gegenbauer 1859, classe Trematoda Rudolphi 1808, subclasse Digenea Carus 186, ordem Schistosomatoidea Stiles & Hassal 1898, família Schistosomatidae Stiles & Hassal 1898, gênero *Schistosoma* Weiland 1858 (BERGQUIST et al, 2017; BUTROUS, 2019; WHO, 2020).

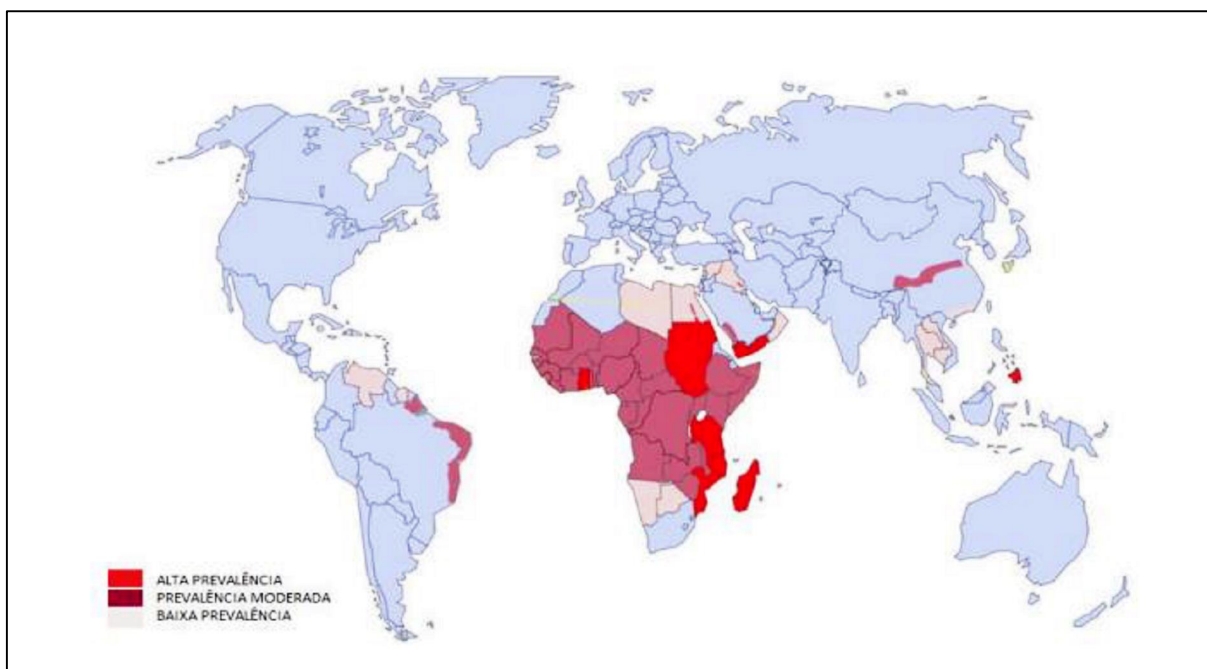


Figura 1. Distribuição mundial de algumas espécies de *Schistosoma* capazes de infectar humanos. Fonte. BUTROUS, 2019.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2018 a esquistossomose foi classificada em segundo lugar no ranking mundial de doenças infecto parasitárias, ocasionando cerca de 200 mil mortes anuais, ficando atrás da malária. Em 2019 a doença foi notificada em 78 países, afetando em média 240 milhões de pessoas e com estimativa de aproximadamente 10% da população mundial (~779 milhões) esteja sob risco de contaminação, por habitarem ou residirem em regiões endêmicas localizadas em países em desenvolvimento, situados na África, Ásia e América Latina. Contudo dentre os países notificados, 19 não possuem ocorrências de novos casos nos últimos cinco anos, o que pode indicar uma possível interrupção da doença nesses países, e em 52 tem transmissões notificadas de moderada a alta. (GBD, 2017; WHO, 2020).

A origem do parasito supostamente decorre da Ásia, que se dispersou para África, tendo indícios da porta de entrada no Brasil ter ocorrido através do tráfico de escravos, sendo o país mais afetado das Américas, com estimativa de 42,9 milhões de pessoas sob risco de infecção e cerca de 1,5 milhões de infectados (GENTILE et al., 2012; LAWTON et al, 2011; SANTOS et al, 2017; BRASIL, 2017; MORAES et al., 2019). A única espécie encontrada no país é *S. mansoni*, considerada endêmica, estando presente em 19 estados da Federação Brasileira, com registros entre os anos de 2008 e 2016 de aproximadamente 500 morte anuais, totalizando 4.473 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; 2021).

No país, o parasito tem como áreas endêmicas e focais os seguintes estados: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal (BRASIL, 2017; MARTINS et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) (Figura2).

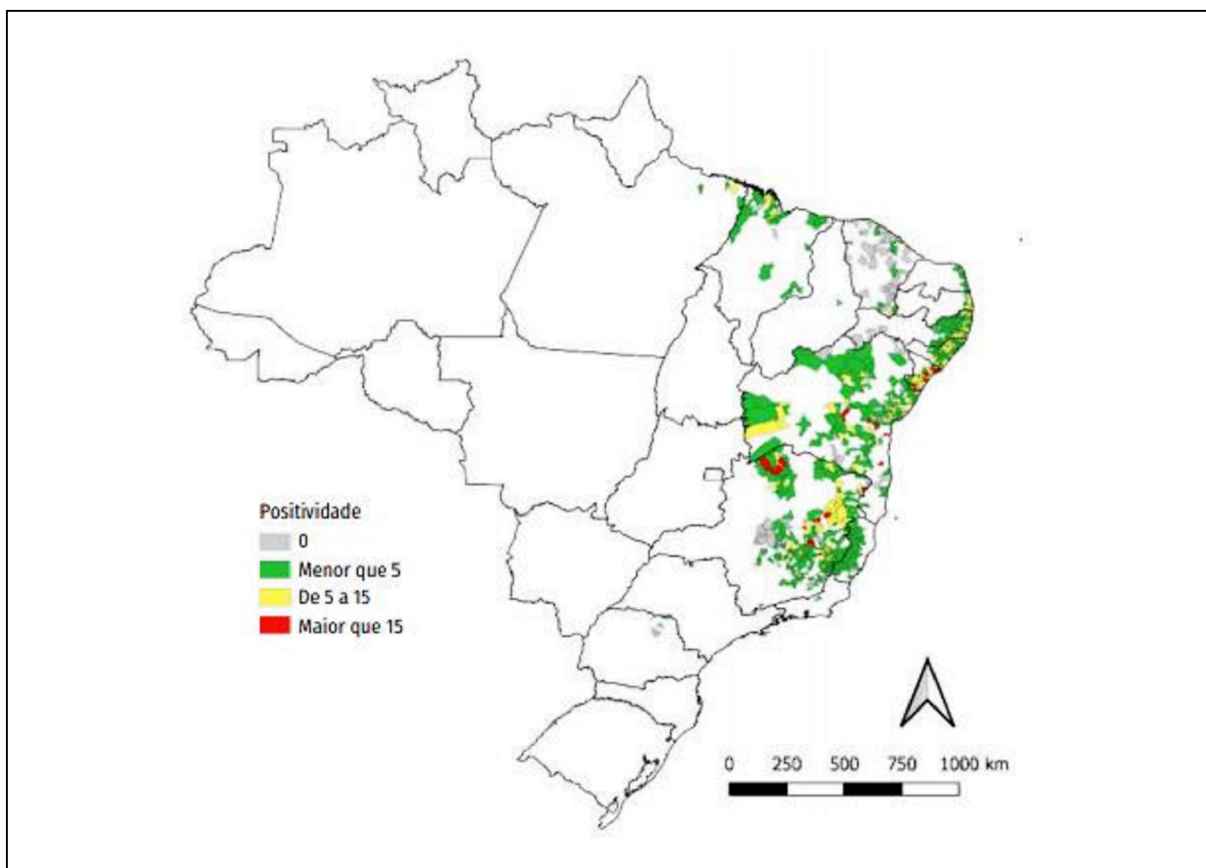


Figura 2. Distribuição geográfica esquistossomose no Brasil segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2020. Fonte. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021.

Entre os estados brasileiros, Minas Gerais possui uma elevada importância epidemiológica para a infecção no país, uma vez que a doença prevalece em 61% dos seus municípios (NOYA et al., 2015; FERREIRA et al., 2017). Contudo a região nordeste do país evidencia taxas elevadas em números de casos e frequência da doença, devido a precariedade de saneamento básico, pobreza, hábitos de vida (pesca e agricultura), migração populacional, clima, presença de hospedeiros intermediários, além das grandes plantações que são mantidas por irrigação, que se transformam em verdadeiros criadouros de moluscos vetores propiciando condições ideais para sua manutenção (PARAENSE, 2001; KLOOS et al., 2010; SANTOS; MELO, 2011).

Outro fator a ser considerado na manutenção de *S. mansoni* no país é a presença de vertebrados mamíferos que atuam como reservatórios do parasito (REY, 1993; GENTILE et al., 2012). Algumas espécies foram descritas como capazes de potencializar a disseminação da esquistossomose em áreas endêmicas, por serem

passíveis de contaminação por *S. mansoni* e possuem modo de vida semiaquáticos, como os roedores *Holochilus sciureus* e *Nectomys squamipes aquaticus* (MARTINS et al., 1955; VEIGA-BORGEAUD et al., 1986; GENTILE et al. 2012; MIRANDA et al., 2015).

No Maranhão, a esquistossomose está presente em 49 dos 217 municípios, sendo 22 municípios endêmicos localizados na Baixada Ocidental Maranhense (CANTANHEDE et al., 2014; MONTEIRO et al., 2018) (Figura 3). Estudos realizados por Mendes (2019) demonstram que os municípios com maior número de casos da esquistossomose na baixada, entre os anos de 2007 a 2016 foram: Cururupu (6.453 casos), Bacuri (5,820), Apicum-açu (5,029), São Bento (3,292), Serrano do Maranhão (2,344) e Peri-mirim (1,384) que corresponderam a 69,9% dos casos da doença no estado do Maranhão.

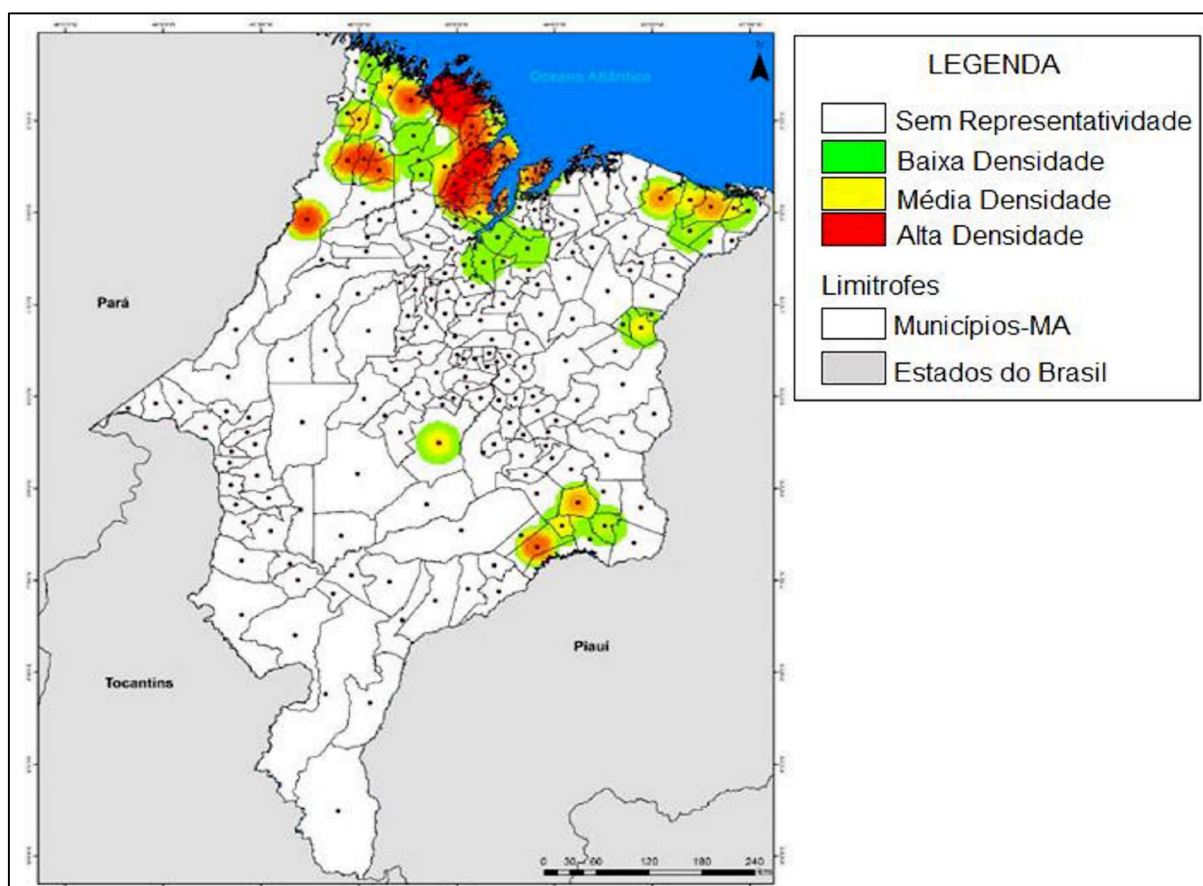


Figura 3. Mapa densidade de casos de esquistossomose por município no estado do Maranhão, 2007 a 2016. Fonte. MENDES, 2019.

2.1.2 Ciclo biológico

S. mansoni possui um ciclo biológico heteróximo (Figura 4), envolvendo a fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário (espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*) e a fase de reprodução sexuada no hospedeiro definitivo (vertebrados, especialmente o homem e pequenos mamíferos) (KATZ; ALMEIDA, 2003; CRISCIONE et al., 2009; WEERAKOON et al., 2015).

As espécies de hospedeiros intermediários pertencem a seguinte taxonomia: gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, filo Mollusca Linnaeus, 1758, classe Gastropoda Cuvier 1797, subclasse 7 Pulmonata Cuvier 1817, ordem Basommatophora Schmidt 1855 e família Planorbidae Rafinesque, 1815 (MALEK, 1985; PARAENSE, 2004; JARNE et al., 2011). Somente as espécies *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), foram encontradas naturalmente infectadas e têm importância na transmissão da esquistossomose no Brasil (PARAENSE, 1972; BUTROUS, 2019).

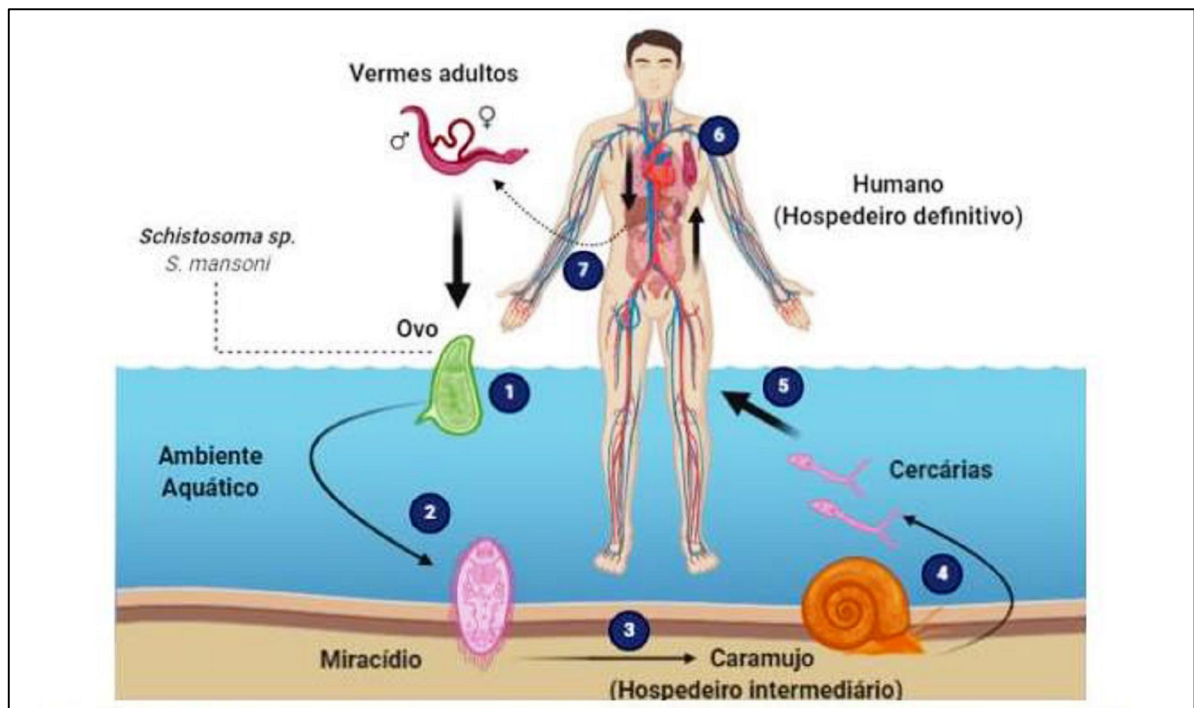


Figura 4. Ciclo Biológico da *Schistosoma mansoni*. (1) Os ovos excretados nas fezes do hospedeiro definitivo eclodem ao contato com a água, liberando miracídeos (2), que penetram no caramujo hospedeiro intermediário (*Biomphalaria* spp.) Dentro do caramujo, os miracídeos se transformam em esporocistos, que por sua vez produzem novas filhas esporocistos. reprodução assexuada. Após 30 dias, as cercárias emergem do caramujo em resposta à luz solar (4) e (5), penetram na pele de um hospedeiro humano (na pele), as caudas caem e as larvas se transformam em esquistossômulos. Os esquistossômulos penetram nos vasos sanguíneos venozos e são levados até os pulmões pelo coração e, em seguida, entram na circulação (6). (7) Ao atingirem o sistema porta hepático, os esquistossomos

migram para as veias mesentéricas do fígado, onde amadurecem e se tornam adultos de sexos separados e copulam. Os vermes fêmeas migram para as veias mesentéricas do intestino, onde a fêmea produz os ovos. Os ovos são liberados na corrente sanguínea, passam pela parede intestinal e são excretados nas fezes, iniciando novamente o ciclo. Fonte. LICÁ, 2020.

O ciclo de vida inicia quando os ovos são eliminados através das fezes de pessoas infectadas, que ao entrarem em contato com a água, eclodem e liberam miracídios, que são guiados por estímulos químicos e luminosos para penetrar no hospedeiro intermediário (GRYSEELS et al., 2006; CARVALHO, 2016).

Uma vez que os miracídios penetram no caramujo, hospedeiro intermediário, perdem sua estrutura ciliada, ocorrendo modificações fisiológicas, dando origem à esporocistos primários e, após 14 dias, esporocistos secundários (CARVALHO, 2016). Após ocorrer sua reprodução assexuada dando origem a cercárias (forma larvária) de *Schistosoma mansoni*, e serem liberadas em ambientes aquáticos por estímulos provocados pela temperatura e luminosidade, nadam por até 72h em busca do hospedeiro definitivo (WOLMARANS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006; MCMANUS et al., 2018). As cercárias possuem em sua estrutura morfológica uma cauda bifurcada de aproximadamente 300 mm e comprimento em torno de 0,2 mm por 0,07 mm de largura (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016).

Ao penetrarem na pele ou mucosa do hospedeiro definitivo, ocorre o início a fase sexuada do ciclo, decorrendo a alterações morfofisiológicas, causadas pelas mudanças de osmolaridade e temperatura, transformando-as em esquistossômulos (KATZ; ALMEIDA, 2003; JAMIESON, 2016; CARVALHO, 2016; MCMANUS et al., 2018). Estes migram da derme e para os pulmões através da corrente circulatória, onde sofrem a fase de alongamento chamado de esquistossômulo pulmonar (REY, 2008). Após esta etapa, eles caem novamente na corrente sanguínea chegando as veias do sistema porta-hepático, onde vai ocorrer a maturação sexual dos vermes e o acasalamento (WILSON et al., 1978; CRABTREE; WILSON, 1986; KRAUTZ-PETERSON et al., 2009). Os vermes adultos alcançam entre 1 a 2 cm de comprimento e 0,3 a 0,6 mm de largura; são dioicos com corpo cilíndrico, possuindo duas ventosas, tegumento complexo, trato digestivo cego e órgãos reprodutivos (LAMBERTUCCI, 2010; VALE et al., 2012; JAMIESON, 2016). O macho possui um canal ginecóforo, no qual a fêmea se instala e, quando acasalados, percorrem pela corrente sanguínea até

as veias mesentéricas, onde as fêmeas iniciam a oviposição (LAMBERTUCCI, 2010; VALE et al., 2012; NEVES et al., 2016).

A produção de ovos ocorre entre o período de 5 a 7 semanas após a infecção, sendo eliminados juntos ao bolo fecal, ocasionando manutenção ao ciclo (COLLEY et al., 2014). Entretanto pode ocorrer o transporte de alguns ovos pela circulação sanguínea para outros órgãos, decorrendo uma reação inflamatória granulomatosa em torno da região onde ficam retidos, quando não deixam os vasos, e se acumulam nos órgãos internos pelo fluxo sanguíneo, especialmente no fígado, onde tornam-se alvo da resposta imune do hospedeiro (BOROS; WARREN, 1970; WARREN, 1982; BURKE et al., 2009; HAMS et al., 2013; CHUAH et al., 2014). Os primeiros ovos são inicialmente encontrados nas fezes após 40 dias da infecção, reiniciando o ciclo (SIQUEIRA-BATISTA et al., 1998; LENZI et al., 2008; SOUZA et al., 2011; CARVALHO, 2016).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado com a investigação clínica do paciente, utilizando métodos laboratoriais auxiliado à anamnese do paciente (VITORINO et al., 2012). O método de diagnóstico mais utilizado entre os métodos laboratoriais é a detecção de ovos do parasito nas fezes, entretanto com o passar dos anos ocorreram diversas alterações no diagnóstico dos detritos fecais, visto que a pessoa que detivesse uma carga parasitária baixa, dificulta a detecção de ovos pelo exame fecal, podendo ocorrer uma prevalência subestimada, dificultando o controle da doença (WHO, 2009; TEIXEIRA, 2011). Perante isso, os ensaios imunológicos e a biologia molecular apresentam alternativas no diagnóstico da infecção (TEIXEIRA, 2011; GRYSEELS, 2012).

2.1.3.1 Métodos parasitológicos

Os exames parasitológicos para detecção da infecção embasam-se em: (a) análise macroscópica, investigando a consistência, presença de sanguínea e/ou porções do parasito; e (b) análise microscópica, investigando a presença de ovos ou larvas dos parasitos eliminados junto às fezes. Dentre as análises, temos os métodos qualitativos, como, métodos de Sedimentação Espontânea ou apenas HPJ (LUTZ, 1919; modificado por HOFFMAN et al., 1934) e o Centrífugo-sedimentação (MIFC) ou

método de Blagg (BLAGG et al., 1955); e os métodos quantitativos mais usuais são os métodos de KatoKatz (KATO; MIURA, 1954; modificado por KATZ et al., 1972) e Helmintex® (TEIXEIRA et al., 2007).

2.1.3.2 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos baseiam-se na descoberta de anticorpos (detecção) ou de antígenos circulantes, com maior eficácia no diagnóstico de indivíduos infectados com baixa carga parasitaria (VAN LIESHOUT et al., 2000; DOENHOFF et al., 2004). Os métodos utilizados são o de dosagem sorológica dos antígenos circulantes [Antígenos Anódicos Circulantes (CAA) e Antígenos Catódicos Circulantes (CCA)] de *S. mansoni* (possibilidade de detecção na urina) (RABELO, 1997; GRYSSELS, 2012; ADRIKO et al., 2014).

2.1.3.3 Ensaios de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular possuem ferramentas importantes para diagnóstico de diversos patógenos, por possuir alta sensibilidade e capacidade de diferir as espécies pertencente ao mesmo gênero. A Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR) identificou *S. mansoni* em amostras fecais e de urina pertencente de humanos, bem como em caramujos infectados (STEINAUER et al., 2010). Além do que, marcadores genéticos, como microssatélites e DNA mitocondrial vêm sendo utilizados como uma ferramenta de investigação (DURAND et al., 2000).

2.1.4 Controle da esquistossomose

Apesar dos diagnósticos serem aliados aos programas de controle da esquistossomose, ainda permanece como sendo um grande desafio para os países endêmicos. As medidas e estratégias de controle se fundamentam em programas públicos de saneamento básico, educação sanitária, controle dos moluscos hospedeiros e tratamento dos infectados. O embate econômico da esquistossomose é sentido nos grupos sociais, especialmente em países pobres e em populações que vivem sob condições difíceis; pois o fornecimento de água tratada, instalações sanitárias e o destino adequado dos esgotos sanitários são ferramentas básicas para

o controle da doença a médio e longo prazo (BERGQUIST, 2002; FENWICK; WEBSTER, 2006; STEINMANN et al., 2006; BROOKER et al., 2009).

O controle da esquistossomose era conduzido anteriormente ao hospedeiro intermediário, através dos moluscicidas químicos, entretanto esses causam alterações no ambiente (CARVALHO et al., 2008).

A quimioterapia da esquistossomose é baseada apenas no uso de um fármaco, o Praziquantel (PZQ), que apresenta eficácia no tratamento das cinco espécies mais importantes de *Schistosoma*, já sendo utilizado há cerca de 30 anos como estratégia de controle do parasito em áreas endêmicas (WANG et al., 2012). Contudo apesar de demonstrar eficácia na redução da morbidade, a utilização da droga tem sido menos promissora do que desejado, pois seu uso extensivo e inapropriado culminou no aparecimento de resistência (CAFREY, 2007; DOENHOFF et al., 2008).

A resistência a medicamentos tem sido relatada com frequência em muitos focos endêmicos de *S. mansoni* (WANG et al., 2012). Além disso, o fármaco apresenta eficácia apenas contra vermes adultos do esquistossomo, não atuando nas formas jovens do parasito (UTZINGER et al., 2003). Considerando as falhas terapêuticas e a intolerância dos pacientes ao tratamento, fica evidente a necessidade de um tratamento mais eficaz da esquistossomose. A OMS recomenda a busca de novos fármacos para o tratamento da doença. Entretanto, o processo de desenvolvimento de novos medicamentos é um processo longo e dispendioso (ARAÚJO, 2010). Dessa forma, se faz necessário novas alternativas e/ou complementos terapêuticos, especialmente com uso de produtos naturais (NDAMBA et al., 1994; MOLGAARD et al., 2001; SANDERSON et al., 2002; MOHAMED et al., 2005; BRASIL, 2014).

Devido a necessidade de novas alternativas terapêuticas e a utilização popular no uso de plantas no tratamento das parasitoses intestinais, especialmente a esquistossomose, e efeitos colaterais do fármacos usual e ao aumento da resistência dos parasitos ao fármaco, foi realizada uma revisão para investigação de produtos naturais; sendo evidenciado que extratos das folhas espécies de *Passiflora* demonstram potenciais contra a esquistossomose, sinalizando para potencial de espécies o gênero na Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de novas alternativas e/ou complementos terapêutica no combate a esquistossomose.

2.2 O Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae está distribuída largamente por todo o neotrópico (TROPICOS, 2018), que se divide em: tribo *Paropsieae* DC e tribo *Passiflorieae* DC (ESCOBAR, 1988). Na América do Sul é encontrada apenas a tribo *Passiflorieae* (IMIG, 2013). No Brasil já foram identificadas cerca de 153 espécies da família Passifloraceae, distribuídas em 04 (quatro) gêneros: *Ancistrothyrus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (BERNACCI et al., 2015).

O gênero *Passiflora* é um dos maiores de espécies já descritas, com cerca de 520 espécies; sendo destaque no Brasil pela diversidade, com 83 espécies endêmicas de 150 espécies nativas (BERNACCI et al., 2015;). Dentre essas, merece destaque: *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora ligularis* Juss. e *Passiflora quadrangularis* L. por serem de maior propagação (MELETI, 2011).

As espécies de *Passiflora* são conhecidas popularmente como maracujazeiros, ocorrendo variações de acordo com a espécie (MESQUITA, 2019). A origem da palavra maracujá vem do tupi, cujo significado é “alimento em forma de cuia”; também é conhecida como “passionflower” para os ingleses, significando flor da paixão, relacionando com o símbolo da Paixão de Cristo (FALEIRO et al., 2005).

As plantas são caracterizadas por serem trepadeiras lenhosas ou herbáceas, com gavinhas axilares (GENEROSO, 2018). Tem caule cilindro, folhas alternas, pecioladas, inteiras ou lobadas, algumas vezes caducas. Flores actinomorfas, solitárias ou inflorescências, apresentam brácteas, 05 (cinco) sépalas, 05 (cinco) pétalas e 01 (uma) ou mais séries de filamentos que formam a coroa. Frutos carnosos do tipo baga e sementes comprimidas, com arilo carnoso (CERVI, 1997; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

O cultivo das espécies em sua maioria é para o uso dos frutos na alimentação, *in natura* e no preparo de sucos e sobremesas; é utilizada na ornamentação em decorrência da beleza das flores, e também para fins medicinais, onde o uso das suas folhas é aplicado na produção de medicamentos (BRASIL, 2010; MESQUITA 2019). O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá obtendo cerca de 70% da produção mundial (FALEIRO et al. 2005; COELHO et al., 2011); onde o cultivo comercial se baseia em duas espécies *P. edulis*, que representa 90% dos pomares,

pela produtividade, qualidade e rendimento dos frutos e sucos (MELETTI, 2011; OLIVEIRA et al., 2013; VIANA et al., 2016).

Devido ao crescido uso terapêutico e atividades comprovadas, a espécie *P. edulis* está incluída oficialmente na bibliografia da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2019) como potencial terapêutico.

2.2.1 *Passiflora edulis* Sims

Conhecido popularmente como maracujá, maracujá-amarelo ou maracujá-azedo a espécie *P. edulis* (Figura 5), é nativa da Brasil, sendo a mais difundida devido sua importância na indústria alimentícia (VILEGAS, 2000).

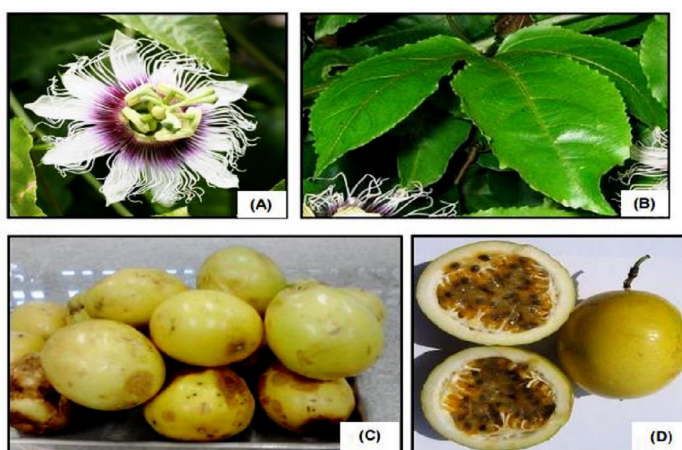


Figura 5. Flor (A), folha (B) e frutos (C; D) de *P.edulis* Sims. Fonte. Rodrigues (2013).

Atualmente, a distribuição taxonômica desta espécie segundo Plants Database, (2019) é a seguinte:

Reino: Plantae

Ordem: Violales

Subreino: Tracheobionta

Família: Passifloraceae

Divisão: Magnoliophyta

Gênero: *Passiflora* L

Classe: Magnoliopsida

Espécie: *Passiflora edulis* Sims

Subclasse: Dilleniidae

Na América do Sul, *P. edulis* é empregada na terapêutica como: sedativo, diurético, anti-helmíntico, em tratamento de hipertensão e fenômenos da menopausa. Contudo, o uso de *P. edulis* não é restrito aos países sul americanos (MIRODDI et al., 2013).

De acordo com Jamir et al. (1999), o extrato das folhas frescas de *P. edulis* é empregado na Índia no tratamento de hipertensão, disenteria e na dependência a morfina (INGALE; HIVRALE, 2010), enquanto na Ilha da Madeira os frutos de *P. edulis* são utilizados no tratamento de tumores gástricos (WATT; BREYERBRANDWIJK, 1962). No Peru, o suco do fruto é empregado no tratamento de infecções urinárias e como sedativo leve (TAYLOR, 2005). Na Polônia é empregado para histeria e neurastenia. Na Turquia, para dismenorreia, epilepsia, insônia, neurose e neuralgia (TAYLOR, 1996). Na Argentina e no México é utilizada pelos efeitos sedativos (RODRIGUES-FRAGOSO et al., 2008). Em outros países da América também é utilizado no tratamento de diarreia, síndrome pré-menstrual, dismenorreia, queimaduras, antiespasmódicos e analgésico (NEUWINGER, 2000; DHAWAN et al., 2004).

O fruto de *P. edulis* é empregado para alívio à constipação e estimulante digestivo e sedativo. O chá das folhas serve como calmante sedativo e antiespasmódico (LORENZI; MATOS, 2008). O mesocarpo é utilizado para o tratamento de diabetes (AGRA et al., 2007); e as raízes e semente são anti-helmínticas (CERVI, 1997).

Devido à grande utilização das folhas das espécies *Passiflora* na prática popular gerou o interesse da indústria farmacêutica; pois as folhas dessas espécies são empregadas como componente ativo de preparações fitoterápicas, em forma de comprimidos, infusões e/ou tinturas (RUDNICKI, 2005). Além da espécie *P. edulis*, na prática popular *Passiflora incarnata* e *Passiflora alata* também são empregadas, representando as espécies do gênero mais estudadas quanto composição química e propriedades farmacológicas, por isso estão incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS), pelo potencial farmacológico (BRASIL, 2009).

As propriedades farmacológicas, a comprovação e validação dos efeitos ansiolíticos e sedativos de extratos de *Passiflora* promoveu a produção de medicamentos para estas finalidades; além de estudos que demonstram a utilização de *P. edulis* na fabricação de medicamentos para tratamento de outras patologias (MESQUITA, 2019).

2.3 Espécies vegetais na Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novas opções terapêuticas: estudo de validação

A constatação ascensão do uso plantas e preparações derivadas na prática popular, sem comprovação científica dos parâmetros de eficácia, segurança e qualidade têm merecido atenção da Farmacovigilância; ocasionando determinações normativas do Governo Federal relacionadas à Política Nacional de Fitoterápicos no sentido de minimizar riscos associados ao uso irracional. Nesse sentido, fica evidente a necessidade de desenvolvimento dos estudos científicos, em busca de definição de critérios para fundamentar o uso de tais recursos terapêuticamente; com base nos estudos de validação (MIGLIATO et al., 2011; BORELLA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; SIMÕES et al., 2017).

Para que uma espécie vegetal seja utilizada como uso medicinal, deve ser garantido que os estudos embasados em metodologias para avaliação da eficácia, segurança e qualidade das plantas para que ocorra validação, permitindo assim seu uso como medicamento. Portanto os estudos de validação representam o caminho para a transformação das plantas em produtos fitoterápicos (MACIEL et al., 2002; BRANDÃO et al., 2012; BRITO et al., 2016; SIMÕES et al., 2017).

A investigação de espécies vegetais deve ser vista como ação social uma vez que grande parte da população a emprega como medicamento; exigindo assim que seja alvo das mesmas exigências e investigações de um medicamento; com atendimento aos rigores técnicos e legais (MOREIRA et al., 2014).

Assim, para que ocorra a conversão de uma planta em medicamento, visando um produto tecnicamente formulado, exige a utilização de procedimentos de transformação tecnológica, visando assegurar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, certificando a constância da ação biológica e a segurança e qualidade na utilização (SIMÕES et al., 2017).

Para obtenção de um medicamento transformado a partir de uma espécie vegetal, é necessário que essa espécie passe a ser alvo da interação inter e multidisciplinar, abrangendo estudos etnodirigidos, botânicos, agrônômicos, químicos, biológicos (farmacologia e toxicologia pré-clínica e clínica) e farmacêutico (desenvolvimento de metodologia analítica de controle de qualidade e produção tecnológica) (CHABARIBERI et al., 2009; SIMÕES et al., 2017) (Figura 6).

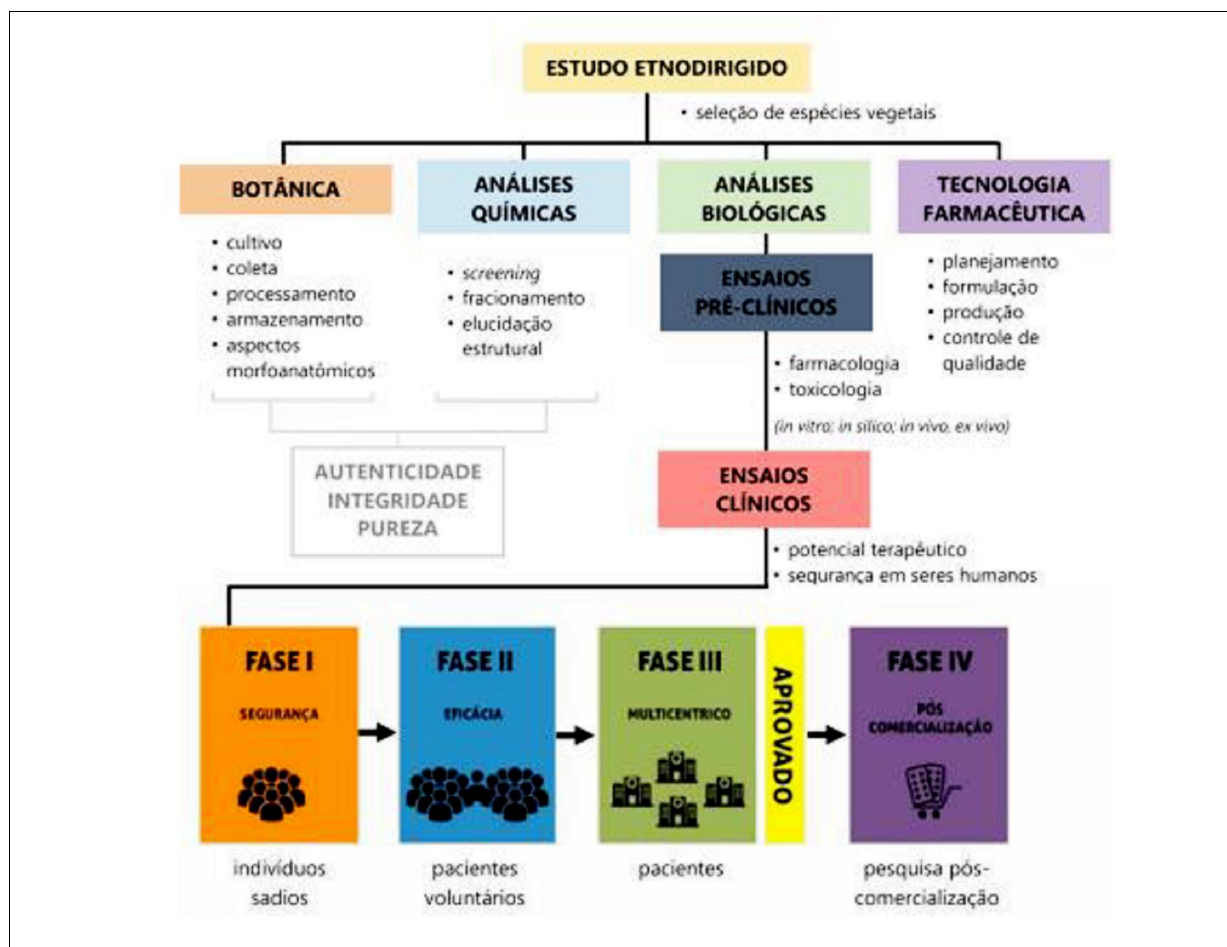


Figura 6. Fases da Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de medicamentos a partir de espécies vegetais. Fonte. AMARAL et al. (2021)

A pesquisa e desenvolvimento (P & D) de fármacos a partir de plantas além de ser um processo longo, complexo e de alto valor financeiro; exige estratégias de seleção da espécie para investigação científica. Embora reconhecendo a grande contribuição dos estudos etnodirigidos no processo de P & D de um fitoterápico, considerando que o uso prolongado por determinados grupos étnicos pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos; não é recomendável o pensamento comum que o uso popular e tradicional seria suficiente para validar espécies vegetais como medicamentos (AMARAL, 2007; GODINHO, 2017; AMARAL et al., 2021).

A validação de espécies vegetais visa a comprovação da segurança (ausência de efeitos tóxicos e inexistência de contaminantes nocivos à saúde), eficácia (comprovação dos efeitos biológicos) e qualidade (obediência ao conjunto de critérios que caracterizam o material vegetal para o uso ao qual se destina); o que

exige a obediência a determinações legais vigentes como qualquer outro medicamento (BRASIL. Resolução CNS-MS nº 196/96; BRASIL. Resolução ANVISA-MS nº 899/03); bem como a determinações legais específicas (BRASIL. Resolução ANVISA-MS nº 48/04; BRASIL. Decreto nº 5813/06).

Ensaio biológico pré-clínico envolve as fases de ensaios *in vitro* (células e órgãos isolados); *in silico* e *in vivo* (animais de laboratório) na determinação dos parâmetros toxicológicos (toxicidade aguda e crônica) e farmacológicos (estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos) (LAPA et al., 2016; ARAUJO, 2018; LOPES, 2020).

A evolução dos estudos de culturas de células e tecidos, constatado nas últimas décadas, contribuíram significativamente para a representatividade atual da etapa dos ensaios *in vitro* na avaliação do potencial citotóxico, especialmente a partir de matéria prima vegetal; possibilitando procedimento de rastreamento rápido, sensível, reprodutível, fácil de gerenciar, automatizado e barato na seleção de potenciais fármacos nas misturas complexas de compostos naturais; bem como na identificação de possíveis alvos moleculares para ataque terapêutico seletivo e elucidação do mecanismo de ação e resistência (TRACY; WEBSTER JR., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar eficácia e segurança do extrato das folhas de *P. edulis* (EPE) no controle de *S. mansoni* como alternativa e/ou complemento terapêutico ao praziquantel.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar parâmetros de citotoxicidade do EPE;
- Investigar atividade esquistossomicida *in vitro* do EPE;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vivo* do EPE isolado e em associação ao Praziquantel em camundongos infectados por *S. mansoni*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica

A coleta das folhas de *P. edulis* foi realizada em áreas de cultivo conforme metodologia descrita (CORREA-JUNHO, 2013), e autorizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob cadastro A24E345, para fim de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico. As folhas de *P. edulis* foram coletadas no primeiro semestre do ano de 2019, na cidade de Paço do Lumiar, estado do Maranhão, Brasil (2° 30' 9" S; 44° 9' 27" W). A espécime foi depositada no Herbário Ático Seabra, da UFMA, sob o número de 1155, autenticada pela Prof^a Dr^a Ana Zélia Silva.

4.2 Obtenção do extrato de *P. edulis*

O extrato das folhas de *P. edulis* foi obtido segundo técnica de padronização definida por Mesquita (2019). As folhas coletadas segundo procedimento anteriormente descrito (item 4.1) foram secas, separadamente, a 40°C, em estufa com circulação de ar, sendo pulverizadas com moinho de facas para obtenção de pó moderadamente grosso (partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 µm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 µm). O pó das folhas de *P. edulis* foi extraído com etanol a 70%, por maceração, utilizando hidromódulo 1:8 (razão droga/solvente) durante 48 horas.

A solução extrativa, foi concentrada a 40°C em evaporador rotativo sob vácuo para obtenção do extrato. Em seguida foram liofilizadas para obtenção do extrato seco.

4.3 Ensaios de citotoxicidade

4.3.1 Citotoxicidade utilizando célula de linhagem GM-0749

As análises da citotoxicidade *in vitro* do extrato de *P. edulis* foram realizadas em modelo de células de fibroblasto linhagem GM-0749, pelo método do Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação de células viáveis (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

4.3.1.1 Linhagem e cultivo celular

A linhagem celular foi gentilmente cedida pela Prof^a. Ana Paula Azevedo, do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer da UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís. As células foram cultivadas em garrafas de 25 m², utilizando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (Gibco, BRL) e 1% de Gentamicina. As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada, em presença de 5% de CO₂ para a adesão, crescimento e replicação, até obtenção da quantidade de células necessárias para testes de citotoxicidade *in vitro*. Os repiques celulares foram feitos sempre que atingiam uma confluência de 80 - 100%, que ocorreram entre 48 - 72 horas.

4.3.1.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida utilizando-se o teste do MTT descrito por Mosmann (1983), com modificações. Utilizando placa de 96 poços foram distribuídas as células (2×10^4 células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB). As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Depois de 24 horas de incubação foi realizado o tratamento com 08 (oito) concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 e 7,8 µg/mL) do extrato hidroetanólico de *P. edulis*, utilizando como controle negativo apenas o meio DMEM e positivo DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Após 48 e 72 horas de tratamento, o meio de cultura das células foi retirado e as células foram incubadas com 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) a 37°C em presença de 5% de CO₂ por 3 h. Após o período de incubação a solução de MTT foi removida e os cristais de *formazan* foram dissolvidos com 100 µL de álcool etílico P.A. A absorbância foi determinada a 540 nm, em leitor automático (Epoch).

Os ensaios foram realizados em triplicata. Vinte e quatro horas antes do tratamento com o extrato, as células foram incubadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/mL) com meio completo para aderência e crescimento por 24 horas, atingindo 60 - 70% de confluência (DENIZOT; LANG, 1986).

4.3.2 Atividade hemolítica

Sangue de carneiro desfibrinado (EB FARMA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado para este ensaio. Os eritrócitos foram centrifugados a 2000 rpm (Centrifugadora 5810R, Eppendorf) por 10 min, a 4° C. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados 03 (três) vezes com PBS (pH 7,4). Em seguida, foram ressuspensos no mesmo tampão a 2% (v/v). Para avaliar a atividade hemolítica do extrato, alíquotas de 100 µL da solução eritrocitária foram adicionadas a microplacas de 96 poços, e submetidas a diferentes concentrações do extrato (7,8 a 1000 µg / mL). A hemólise total ocorreu pela adição de Triton x-100 (1%) (Sigma-Aldrich), enquanto o PBS foi usado como controle negativo. Após incubação por 60 min, em temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância a 540 nm (SILVA et al., 2016). A atividade hemolítica relativa foi expressa em relação ao Triton X-100, calculado pela seguinte fórmula:

$$HEMÓLISE (\%) = \left[\frac{(DO \text{ tratamento extrato} - DO \text{ tratamento PBS})}{DO \text{ tratamento Triton x} - 100 - DO \text{ tratamento PBS}} \right] \times 100\%$$

Os ensaios foram realizados em quintuplicatas pelo menos 02 (duas) vezes.

4.4 Caramujos *Biomphalaria glabrata*

Os espécimes de *B. glabrata* foram gentilmente cedidos pelo Moluscário do laboratório de Imunologia de Helminthos do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose (GIDE), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Seguindo as normas de transporte de material biológico, os caramujos foram transportados contendo a cepa LE de *S. mansoni*. Esta cepa tem sido mantida por sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

Os espécimes foram mantidos no Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão, em aquários de vidro com água desclorada (GERKEN, 1977). Para sua nutrição e fortalecimento da concha, os caramujos tiveram

como substrato uma fina camada de argila, acrescida com carbonato de cálcio e farinha de ostra, e como alimento, folhas de alface, segundo Malek (1985).

4.5 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*

Os vermes foram obtidos por perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9% w/v) (SMITHERS; TERRY, 1965) de camundongos com sessenta dias de infecção. Vermes machos foram imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 suplementado com 100µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal e lavados duas vezes com este meio. Os vermes foram distribuídos (dois vermes por poço) em placas de cultura com 24 poços com 2mL (por poço) do meio suplementado e as culturas incubadas a 37°C, em estufa de CO₂. Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes ao meio de cultura, o EPE foi adicionado nas concentrações de 250µg/mL, 150µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 10µg/mL. Vermes incubados em meio RPMI suplementado serviram como grupo controle negativo. Vermes incubados em 10µg/mL de PZQ serviram como controle positivo. Esse ensaio foi realizado três vezes, em quadruplicata, para cada grupo. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais dos vermes, incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência, monitorizada nos tempos de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 64 e 72 horas de cultura. Os procedimentos citados foram feitos com base no protocolo de Rodrigues et al (2020).

4.5.1 Critérios de avaliação esquistossomicida e cálculo de CI₅₀

O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiram nenhum tipo de movimento após 2 minutos de observação. A motilidade dos vermes foi pontuada após o tratamento com EPE e PZQ de acordo com os critérios de viabilidade marcados numa escala de 0-3 proposto por Horiuchi et al. (2005). Resumidamente o sistema de pontuação foi seguinte: 3 = movimento corporal completo; 2 a 1.5 = mobilidade lenta e parcial; 1 = atividade mínima, mas o verme ainda vivo; 0 = verme morto.

A concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (CI₅₀), foi expressa com limite de confiança de 95%, por meio do método de regressão linear, utilizando os dados do logaritmo da concentração das amostras versus o percentual de vermes

mortos, para cada tempo de análise. O software utilizado para a realização desses cálculos foi o GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

4.6 Avaliação da oviposição *in vitro* de *S. mansoni*

Para este ensaio, um casal foi utilizado por poço e o tempo de análise foi de 48 horas, utilizando a concentração de 58.02 µg/mL para o EPE (grupo teste), dose encontrada neste estudo, com base na concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (CI₅₀) nesse tempo. No grupo controle positivo foi utilizada uma dose sub letal de PZQ (0,5 µg/mL), de acordo com Mendonça et al. (2016). No grupo controle negativo foi utilizado meio RPMI suplementado. Um microscópio invertido foi utilizado para contabilizar os ovos em cada poço contendo o casal ainda viável. Os casais de vermes que eventualmente estavam mortos após as 48 horas, não foram considerados para essa análise. Os testes foram feitos em quadruplicata com duas repetições, seguindo o protocolo descrito por Alves et al (2020).

4.7 Avaliação do efeito esquistossomicida *in vivo*

4.7.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos *Swiss* machos, com peso entre 30-40g e idade entre 52 a 64 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Todas as etapas, desde a manutenção até a experimentação dos camundongos para fins de pesquisa científica, obedeceram aos princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O certificado de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o nº 23115.002254/2020-18 (ANEXO 1).

4.7.2 Obtenção das cercárias

Os caramujos foram acondicionados individualmente em recipientes de vidro, e expostos por quatro horas à iluminação artificial em água desclorada, para estimular a eliminação de cercárias. As larvas obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, posteriormente concentradas e contadas, com o auxílio de uma lupa estereoscópica (SMITHERS; TERRY, 1965).

4.7.3 Infecção dos camundongos

Os animais foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, obtidas de exemplares de *B. glabrata* provenientes da Cepa LE de Belo Horizonte – MG (PERTERS; WARREN, 1980).

4.7.3.1 Caracterização dos grupos e tratamento

Os camundongos foram divididos em 05 (cinco) grupos com 06 (seis) animais cada, sendo 04 (quatro) grupos infectados e 01 (um) grupo não infectado, como demonstra o quadro 1:

Quadro 1. Caracterização e descrição dos grupos controles e testes, e os seus respectivos tratamentos.

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS
Controle Sadio (S)	Camundongos não infectados, que foram utilizados como parâmetro fisiológico.
Controle Negativo (C-)	Camundongos infectados sem tratamento.
Controle Positivo (C+)	Camundongos que foram tratados no 45º dia de infecção com Praziquantel durante sete dias seguidos.
Extrato <i>P. edulis</i> (EPE)	Camundongos que foram tratados no 45º dia de infecção, na fase de vermes maduros (após início da oviposição), por sete dias consecutivos com EPE.
Extrato <i>P. edulis</i> + Praziquantel (EPE+PZQ)	Camundongos que foram tratados no 45º dia de infecção, na fase de vermes maduros (após início da oviposição), por sete dias consecutivos com associação do EPE com Praziquantel.

Fonte: Elaborado pelo autor com base no protocolo de Aires et al. (2014)

O tratamento do grupo EPE foi realizado na dose de 50 mg/Kg (SILVA, 2012) por via oral (PEREIRA et al., 2010). O grupo Controle Positivo foi tratado com PZQ na dose de 50 mg/Kg por via oral (AIRES et al. 2014). O grupo utilizando a associação EPE+PZQ foi empregada a dose de 50 mg/Kg por via oral de cada componente. Os grupos Controle Sadio e Negativo não receberam nenhum tipo tratamento. No 90º dia de experimento, ocorreu a eutanásia de todos animais (AIRES et al., 2014) (Figura 7).

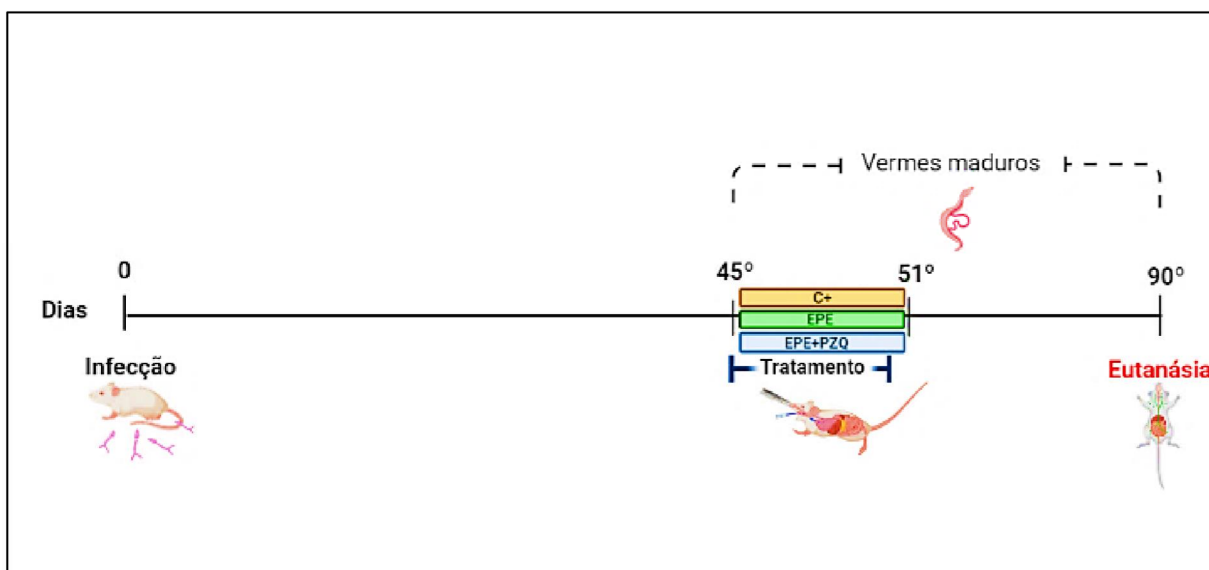


Figura 7. Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.4 Eutanásia dos camundongos

Os animais foram pesados e eutanasiados com sobredosagem de cetamina 300mg /kg + xilazina 30mg/kg (cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10%, intraperitoneal) para realização dos ensaios posteriores (Figura 8).

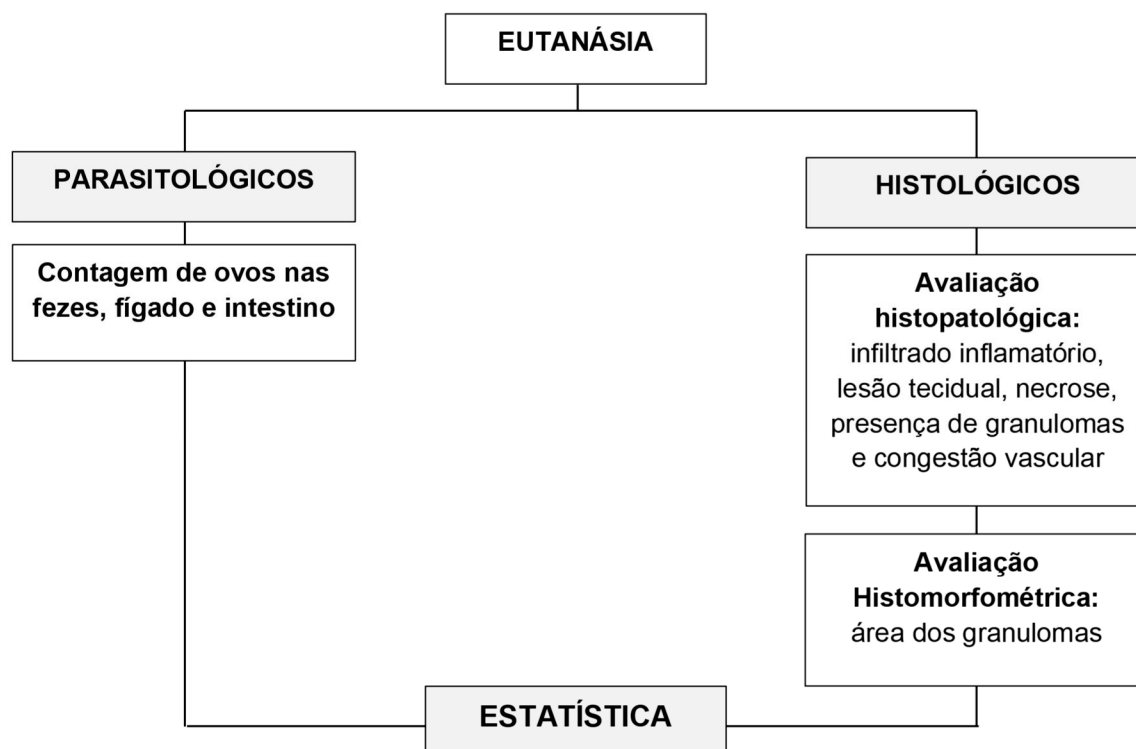


Figura 8. Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.5 Quantificação de ovos eliminados nas fezes

Para quantificar a presença de ovos eliminados nas fezes foi utilizada a técnica de ovos por grama de fezes a partir do protocolo padronizado por Negrão-Corrêa et al (2004). De forma resumida, as amostras de fezes foram coletadas do reto dos animais eutanasiados e pesadas. Estas amostras foram diluídas em 2 mL de solução salina (0,87% NaCl). Após homogeneização, a amostra foi completada com 6 mL de solução formol tamponado a 10%, e posteriormente submetidas a contagem. Para a quantificação, a solução fecal foi homogeneizada, e foram preparadas seis lâminas com alíquotas de 100 µL de cada amostra e examinadas ao microscópio óptico. Posteriormente, foi transformado o valor obtido para ovos por grama de fezes acordo com a fórmula abaixo, onde: 1- Somatório de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da solução fecal; 4- Peso do material (fezes).

$$\frac{\left(\frac{\text{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)}}{\text{2} \rightarrow \text{Nº de lâminas}} \right) \times \text{3} \rightarrow \text{V (mL)} \times 10}{\text{4} \rightarrow \text{Peso (Fezes)}}$$

4.7.6 Quantificação de ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos

A quantificação do número de ovos de *S. mansoni* retido no tecido foi realizado segundo Cheever (1968). Resumidamente, os fígados (lobo direito) foram separados, no ato da eutanásia, pesados e digeridos individualmente em solução de hidróxido de potássio (KOH) 5% a 37°C por 4 h, ou até que não mais se observasse a presença de fragmentos de tecido. O material resultante da digestão tecidual foi transferido para tubos de 15 mL e centrifugados por 1 min/ 200 g. O sobrenadante foi desprezado, cuidadosamente, e foram adicionados mais 14 mL de solução salina (0,87% NaCl). O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes e o material foi ressuspenso em 10 mL de solução salina e armazenado a 4°C até a contagem dos ovos. Para a contagem, seis lâminas com alíquotas de 100 µL de cada amostra foram examinadas ao microscópio óptico. Os ovos foram quantificados de acordo com a fórmula abaixo, e posteriormente apresentados como total de ovos/órgão/animal. Sendo: 1- Somatório

de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da digestão; 4- Peso do material digerido.

$$\frac{\left[\begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{N}^{\circ} \text{ de lâminas} \end{array} \right]}{\boxed{4} \rightarrow \text{Peso}} \times V \text{ (mL)} \times 10$$

4.8 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático

Com relação à análise histológica, amostras de intestino, fígado (parte central do lobo lateral esquerdo) e de pulmão foram retiradas, e fixadas em formol a 10% por 48 horas. Os materiais passaram por uma sequência de imersão em álcool a 70%, 80%, 95% e absoluto 1 e 2. Posteriormente foram imersos em xilol 1 e 2 para clarificação e finalmente, embebidos em parafina histológica para inclusão. Após a inclusão em parafina os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5 µm e os cortes corados com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

Análise histopatológica foi realizada por microscopia óptica de luz comum, avaliando-se parâmetros patológicos (infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose, presença de granulomas e congestão vascular) através do sistema de escore que determina (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso. A análise histomorfométrica foi realizada por software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica para a contagem do número e área dos granulomas. As imagens foram feitas usando um microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (NIS-Elements advanced research). Todas as avaliações foram realizadas por observadores “duplo-cegos”.

4.9 Análises dos resultados

Os dados foram analisados utilizando Software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (S.D). A normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov–Smirnov. O teste *t* de Student foi utilizado e o nível de significância de 5% (um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo). Para avaliação da curva de sobrevivência foi utilizada

a curva de KaplanMeier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank. Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para avaliar a viabilidade *in vitro* dos diferentes grupos.

5 RESULTADOS

5.1 EPE não apresenta citotoxicidade *in vitro*

O efeito do extrato das folhas de *Passiflora edulis* (EPE) em linhagem celular (Figura 9 e 10). O EPE não induziu toxicidade em células de fibroblastos humano GM-0749 mesmo em elevadas concentrações e nos tempos testados de 48 e 72 horas.

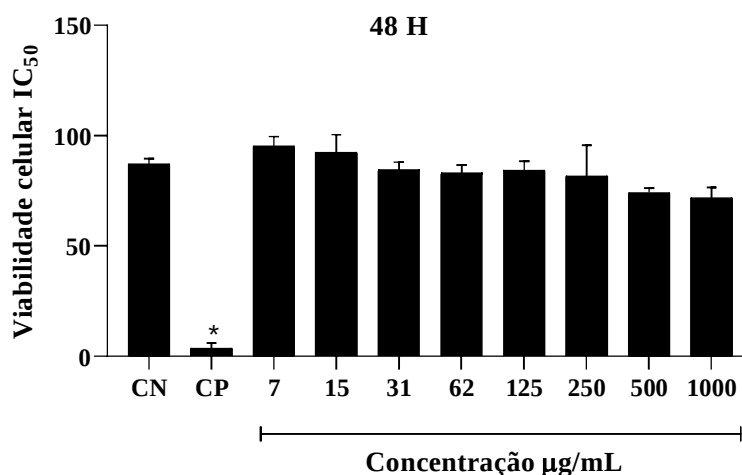


Figura 9. Efeito do extrato das folhas de *Passiflora edulis* em células humanas GM-0749, após 48 horas de incubação. A avaliação foi feita através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. O composto DMSO (2%) foi usado como controle positivo e meio DMEM como controle negativo. Os dados foram analisados por ANOVA no pós-teste de Tukey, com *p <0,05.

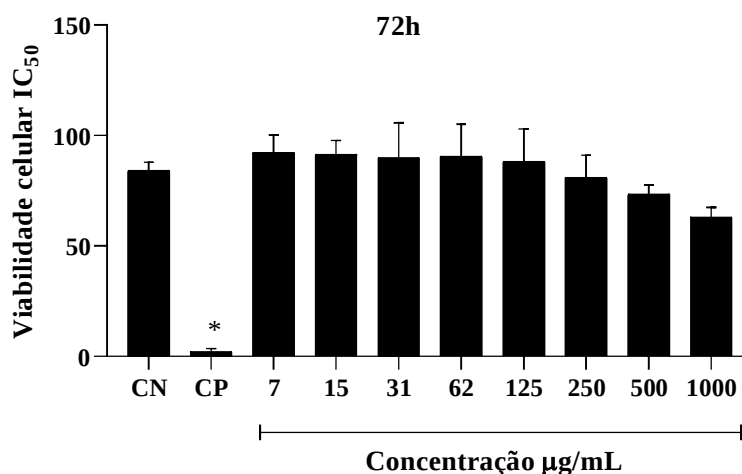


Figura 10. Efeito do extrato das folhas de *Passiflora edulis* em células humanas GM-0749, após 72 horas de incubação. A avaliação foi feita através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. O composto DMSO (2%) foi usado como controle positivo e meio DMEM como controle negativo. Os dados foram analisados por ANOVA no pós-teste de Tukey, com *p <0,05.

O EPE não demonstrou atividade hemolítica, nem na sua maior concentração (Figura 11).

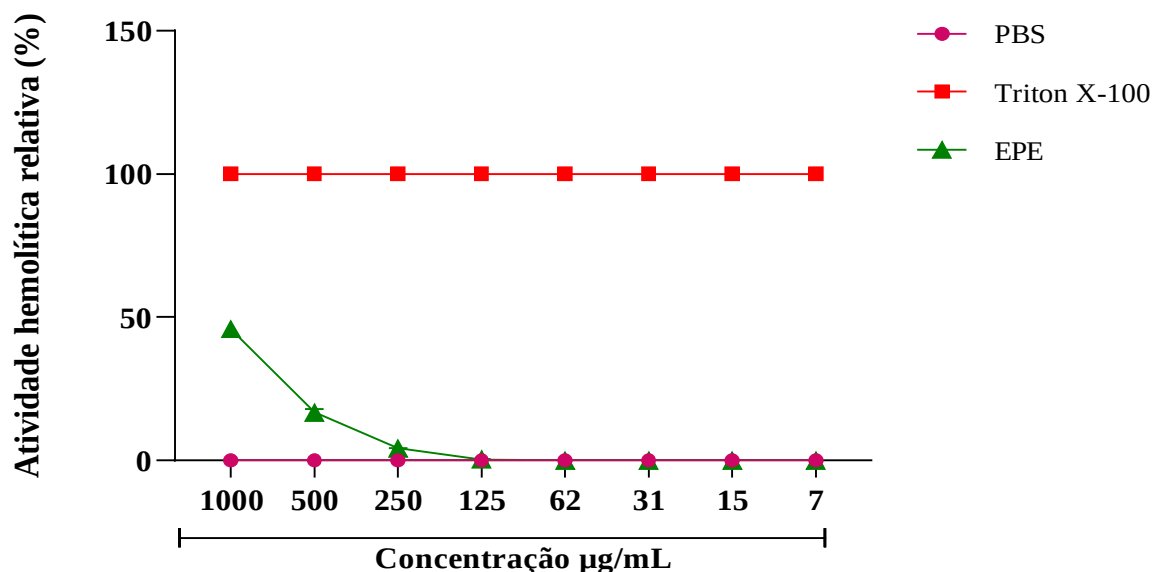


Figura 11. Efeito citotóxico do extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* na atividade hemolítica dos eritrócitos de carneiro. A atividade hemolítica foi comparada ao Triton X-100 (1%), como controle da hemólise. A atividade hemolítica do Triton X foi considerada 100% para análise dos dados. Os dados foram analisados por ANOVA no pós-teste de Tukey, com $*p < 0,05$.

5.2 O EPE apresenta atividade esquistossomicida *in vitro*

No decorrer da exposição dos vermes machos de *S. mansoni* frente a diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de *P. edulis*, foi observada que a morte dos vermes ocorreu de forma mais efetiva foi na concentração de 250 µg/mL, pois, no tempo de 48 horas houve letalidade de 100% dos vermes; já na concentração de 150 µg/mL os helmintos tiveram mortalidade em sua totalidade após 64 horas. Contudo, nem todas as concentrações apresentaram ação esquistossomicida, constatando que as concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL até o tempo avaliado de 72 horas não induziram 100% de letalidade dos vermes. Por outro lado, o Praziquantel (10 µg/mL), controle positivo, induziu 100% de morte dos vermes após 6 horas de cultura.

Os vermes do controle negativo, mantidos em meio RPMI, sem exposição às drogas permaneceram viáveis até o final do experimento, sobrevivendo superior a 72 horas de cultura (Figura 12).

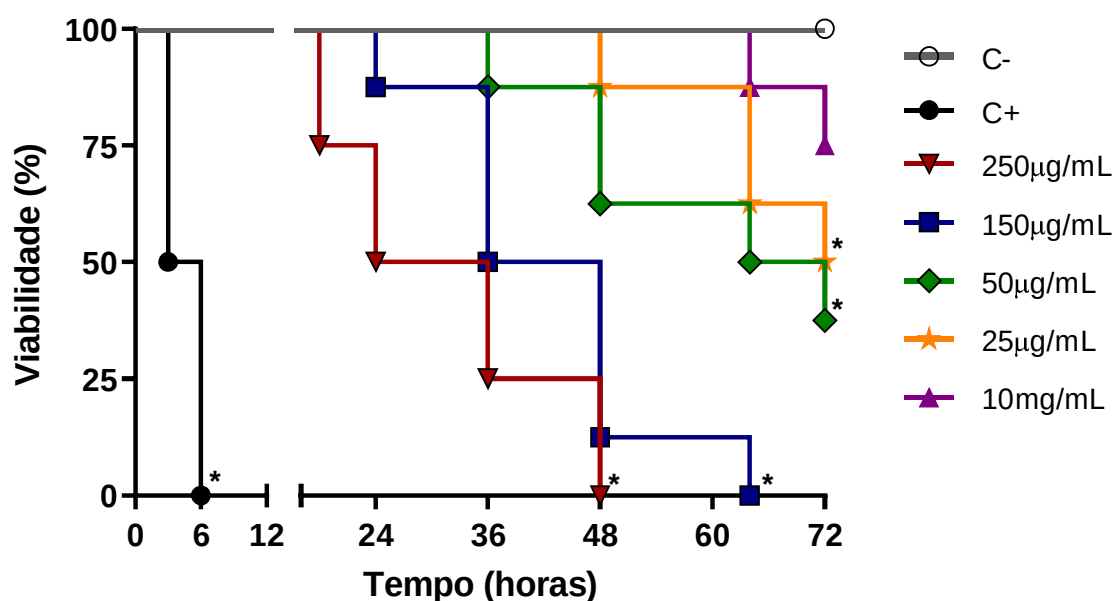


Figura 12. Viabilidade de vermes machos adultos de *S. mansoni* (Cepa LE – Belo Horizonte/MG) durante 72 horas de exposição ao extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis*. Foram utilizados dois vermes machos por poço em quadruplicata em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato. No grupo controle negativo foi utilizado apenas meio e no grupo controle positivo utilizado droga anti-*Schistosoma* (praziquantel). A viabilidade dos vermes foi monitorada através escala de viabilidade que varia de 0 a 3 (3 = movimento corporal completo; 2 a 1.5 = mobilidade lenta e parcial; 1 = atividade mínima ou imóvel, mas o verme ainda vivo; 0 = verme morto), e analisados pelo teste Two-way ANOVA (A). Para avaliação do percentual de sobrevivência foi utilizada a curva de Kaplan Meier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank (B). * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

A partir do cálculo de CI_{50} , foram estabelecidas as concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes nas diferentes horas avaliadas. Essas concentrações variaram de 250.1 a 26.5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Valores das concentrações do extrato hidroalcoólico de *P. edulis* capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes machos de *S. mansoni* em diferentes horas.

	Tempo (horas)				
	24	36	48	64	72
CI_{50} - $\mu\text{g/mL}$	250.1	144.5	58.02	39.7	26.5
IC (95%)	248,2 - 251,7	128,6 - 162,3	52.34 - 64.31	27,13 - 58,13	17,55 - 40,18

^a Os valores de CI_{50} apresentados foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoidal feitas no programa Graph Pad Prism 8.0.

5.3 EPE reduz a oviposição fêmeas de *S. mansoni* tratadas *in vitro*

A avaliação da oviposição de *S. mansoni* teve como objetivo medir a capacidade de reprodução dos vermes sobre a exposição de 58.02 µg/mL para o EPE. A contagem de ovos eliminados pelas fêmeas foi monitorada 48 horas, e comparado com os grupos controle negativo e controle positivo (0,5 µg/mL de PZQ).

O EPE inibiu a oviposição assim como o controle positivo (PZQ). Em contraste os vermes do grupo controle negativo permaneceram acasalados favorecendo sua reprodução.

O número de ovos eliminados pelas fêmeas de *S. mansoni*, dos diferentes grupos são mostradas abaixo (Figura 13).

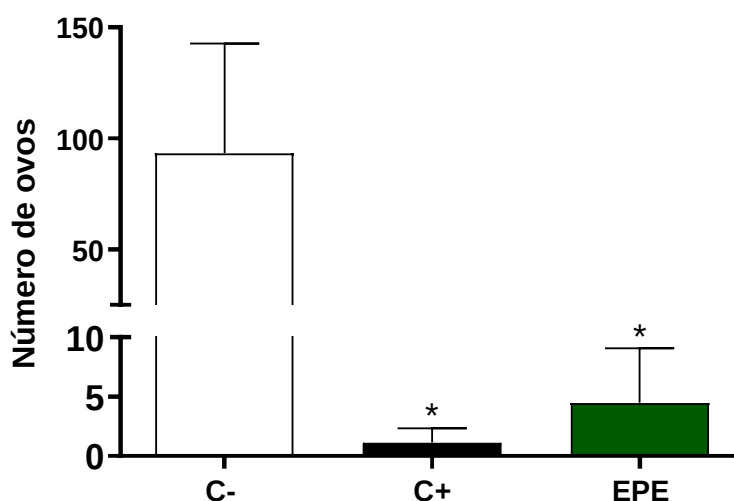


Figura 13. Análise de oviposição de vermes de *S. mansoni*. Efeito do EPE (58.02 µg/mL) na postura de ovos de vermes de *S. mansoni* *in vitro* no tempo de 48 horas. No grupo controle positivo foi utilizada uma dose sub letal de PZQ (0,5 µg/mL), de acordo com Mendonça et al. (2016). No grupo controle negativo foi utilizado meio RPMI suplementado. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

5.4 EPE apresenta efeito esquistossomicida *in vivo*

5.4.1 EPE reduz ovos nas fezes

O tratamento com extrato hidroetanólico de *P. edulis*, e sua associação com Praziquantel (EPE+PZQ), reduziu o número de ovos eliminados nas fezes em relação ao controle negativo (Figura 14). O grupo EPE+PZQ não foi significativo quando comparado ao controle positivo, tratado com Praziquantel.

A associação EPE+PZQ também apresentou o melhor percentual de redução de ovos em relação aos demais tratamentos.

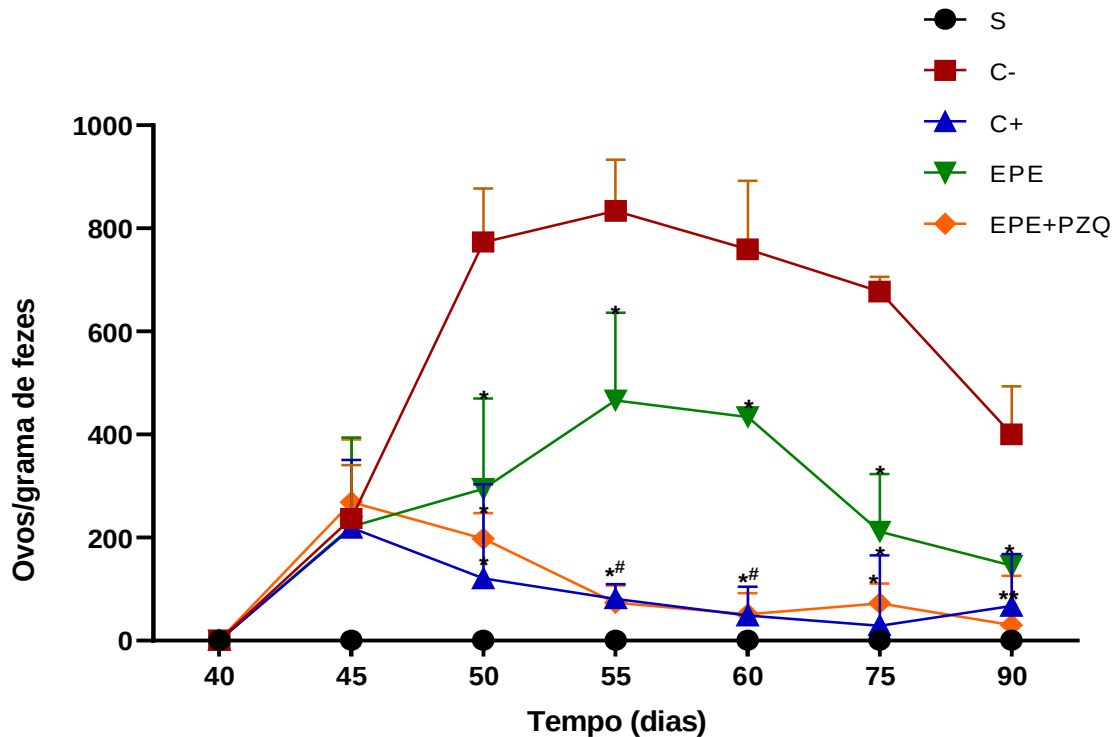


Figura 14. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* sobre o número de ovos presentes nas fezes de camundongos infectados por *S. mansoni*. (S) não infectado. (C-) não recebeu tratamento. Os tratamentos ocorreram entre 45º ao 51º dia por via oral, o controle positivo (C+) foi tratado com Praziquantel na dose de 50mg/kg; o grupo EPE tratado com 50mg/kg do extrato de *P. edulis* e o grupo EPE +PZQ ocorreu a associação dos tratamentos na dose de 50mg/kg de cada composto. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo, # $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com EPE.

5.4.2 EPE reduz ovos nos tecidos

O tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis*, e sua associação com Praziquantel (EPE+PZQ), reduziu o número total de ovos retidos nos tecidos, fígado e intestino, em relação ao controle negativo (Figura 15A e B). Porém a associação não foi significativo quando comparado ao controle positivo, tratado com Praziquantel. Entretanto foi significativo quando comparado com o grupo EPE.

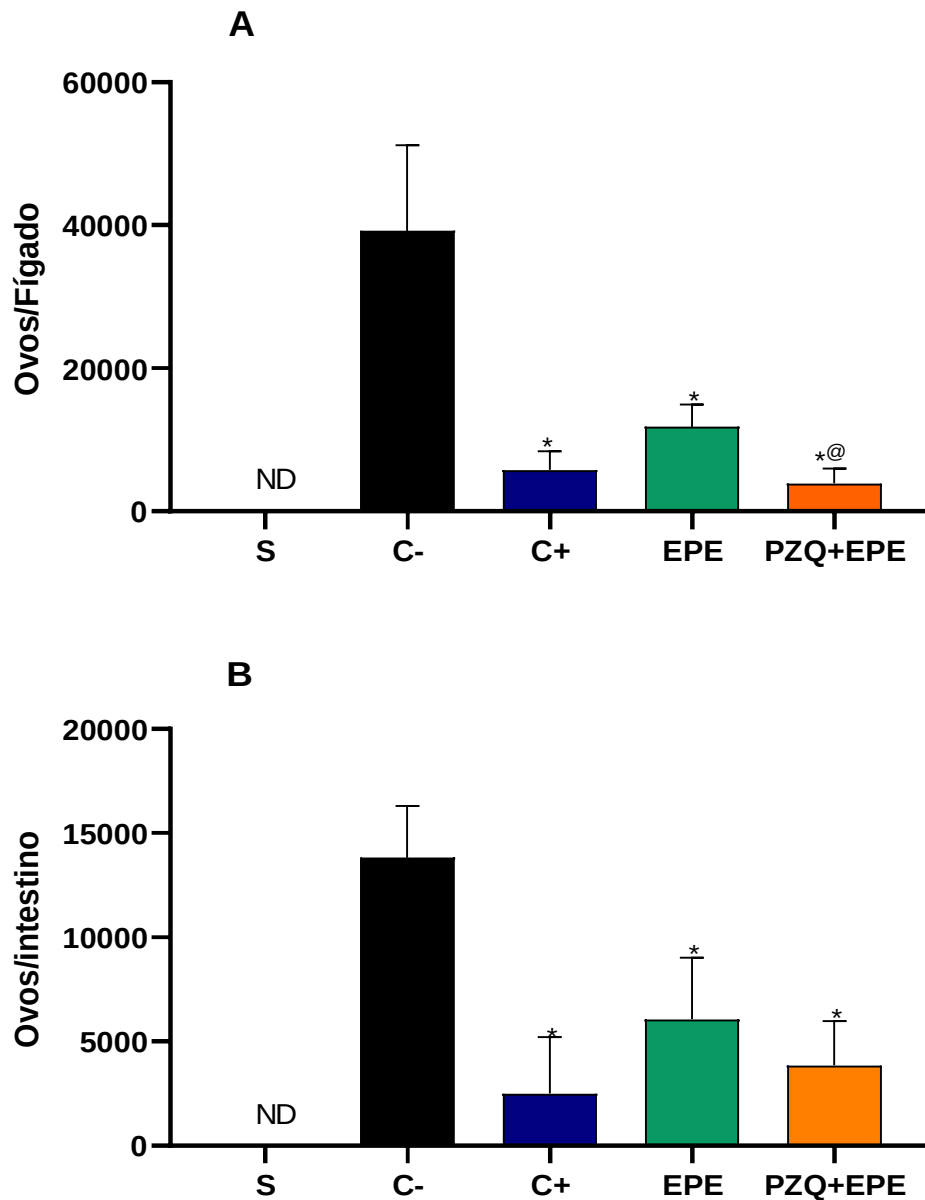


Figura 15. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de *P. Edulis* sobre o número de ovos presentes no retidos no fígado (A) e intestino (B) de camundongos infectados por *S. mansoni*. O número de ovos retidos no fígado e intestino foi quantificado pelo método de digestão completa com KOH 5%. No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 90º dia. O grupo sadio (S) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Os grupos EPE foram tratados (45º ao 51º dia) por via oral com extrato de *P. edulis* com dose de 50mg/kg e o grupo associação EPE+PZQ foram tratados (45º ao 51º dia) por via oral com as respectivas doses 50mg/kg do extrato de *P. edulis* associado a 50mg/kg de Praziquantel. Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; @ $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com EPE.

5.5 EPE reduz a quantidade de ovos e a área dos granulomas

O tratamento com EPE quando comparado ao controle negativo e positivo apresentou redução na quantidade de ovos e da área dos granulomas. Por outro lado a associação EPE+PZQ, quando comparado aos controles positivo e negativo, apresentou redução da lesão tecidual, quantidade de ovos além da extensão do granuloma; quando comparado ao tratamento apenas com o extrato (EPE) houve redução da lesão tecidual e da quantidade de ovos (Tabela 2).

Tabela 2. Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroetanólico de *P. edulis* (EPE) e sua associação com Praziquantel (EPE+PZQ).

	Grupos				
	As	C-	C+	EPE	EPE + PZQ
Infiltrado	0	3±0 ^b	3±0 ^b	3±0 ^b	3±0 ^b
Necrose	0	1±0 ^b	1±0 ^b	1±0 ^b	1±0 ^b
Lesão tecidual	0	2±0 ^b	2±0 ^b	2±0 ^b	1±0 ^b *#@
Presença de granulomas	0	3±0 ^b	3±0 ^b	3±0 ^b	3±0 ^b
Quantidade de ovos	0	3±0 ^b	3±0 ^b	2±0 ^b *#	1±0 ^b *#@
Extensão do Granuloma	0	3±0 ^b	2±0 [*] b	1±0 ^{*#} b	1±0 ^b *#
Fibrose	0	1±0 ^b	1±0 ^b	1±0 ^b	1±0 ^b

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados 90º dia. O grupo sadio (S) não foi infectado. O controle negativo (C-) foi infectado e não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi infectado e tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50 mg/kg. Os grupos EPE e EPE+PZQ também foram infectados e tratados do dia 45 ao 51 na dose de 50mg/kg de cada composto.

^b Os valores representam média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

* p<0.05 em comparação ao controle negativo; # p<0.05 em comparação ao controle positivo; @ p<0.05 em comparação ao tratamento EPE.

Quanto ao número de granulomas por área no tecido hepático (Figura 16A), o tratamento com EPE, PZQ+EPE e praziquantel apresentou redução, em comparação ao controle negativo.

Em relação a área do granuloma no tecido hepático (Figura 16B e 17), os grupos tratados com Praziquantel, EPE isolado ou associado ao Praziquantel apresentaram redução da área, em relação ao controle negativo. Os grupos EPE e

EPE+PZQ, apresentaram redução da área do granuloma, em relação ao controle positivo. Apesar do EPE aparentemente ter um efeito menos eficaz, este diminuiu o granuloma, comprovando seu efeito anti-inflamatório.

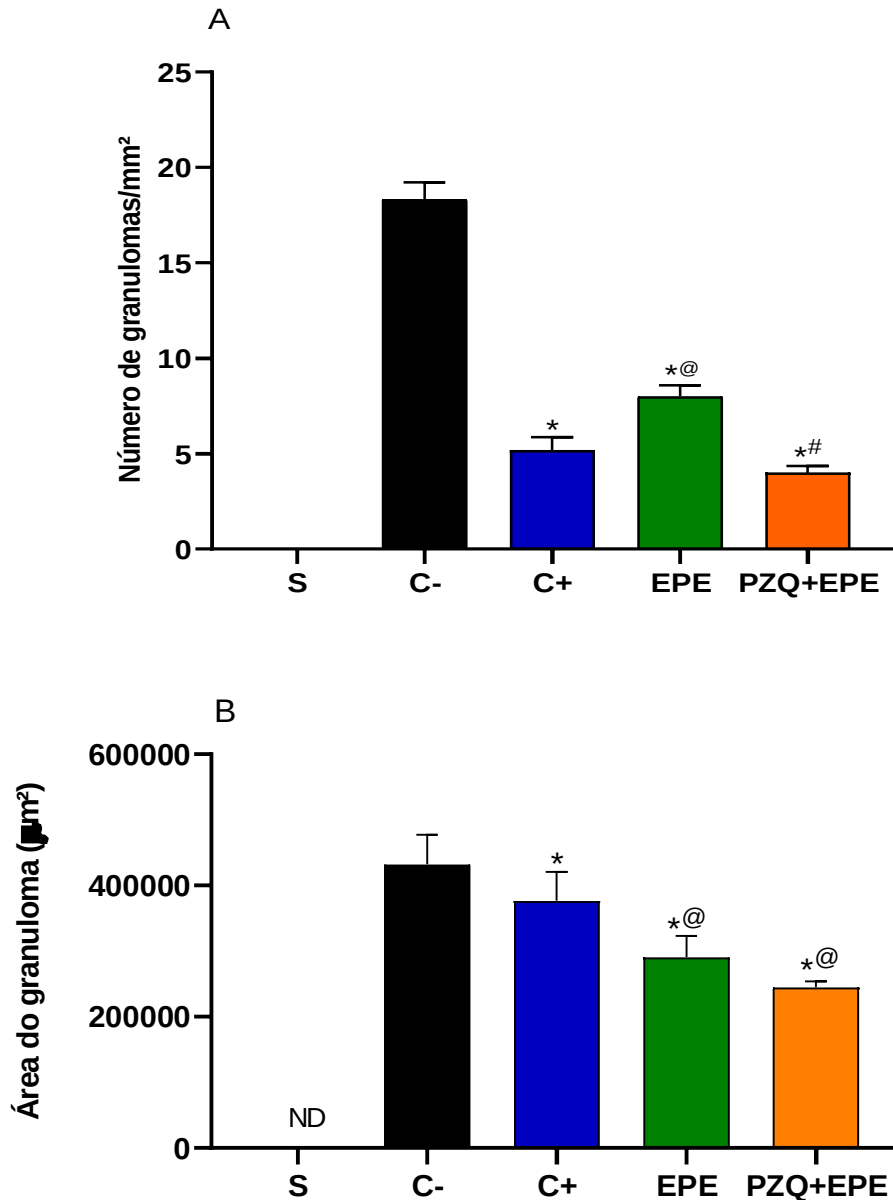


Figura 16. Análise morfométricas da área (A) e número (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroetanólico de *P. edulis* e sua associação ao Praziquantel. A análise foi realizada através do software ImageJ em imagens de cortes histológicos (corado com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado (6 lâminas por grupo de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 90º dia. Grupo sadio (S) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50 mg/kg. O grupo EPE e EPE+PZQ também foram tratados nos dias 45 ao 51 na dose de 50mg/kg de cada composto. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; @ $p < 0.05$ comparado ao controle positivo; # $p < 0.05$ em comparação ao tratamento EPE.

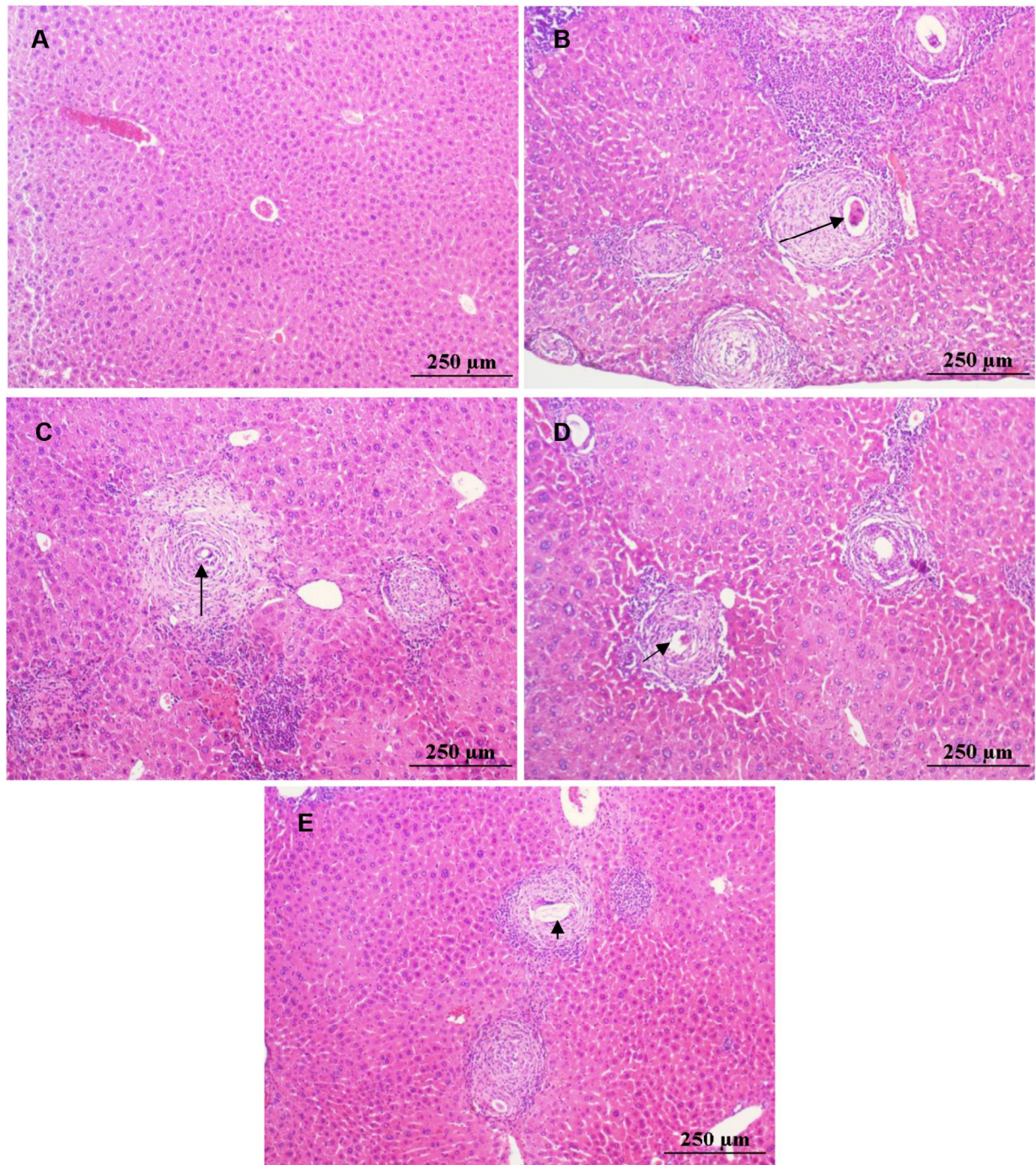


Figura 17. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroetanólico de *P. edulis* e sua associação ao Praziquantel corados com HE (100x). As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 90º dia. Grupo sadio (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50 mg/kg. O grupo EPE (D) e EPE+PZQ (E) também foram tratados nos dias 45 ao 51 na dose de 50mg/kg de cada composto. As setas indicam os ovos nos granulomas.

6 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho evidenciam que a utilização do EPE como tratamento é seguro, por não ser citotóxico; e o seu efeito isolado e a sua associação ao PQZ apresentou ação esquistossomicida *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a carga parasitária da infecção.

Nos ensaios citotóxicos, o extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* não apresentou toxicidade, corroborando com outros estudos de atividades citotóxicas de extratos de *P. edulis*. Estudo *in vivo* realizado por Rojas et al. (2006) utilizando ratos, avaliou DL₅₀ do extrato etanólico de folhas e do suco do fruto de *P. edulis*, em diferentes doses, comprovando que nas maiores doses, os animais apresentaram sonolência excessiva durante o primeiro dia, e estabeleceram a DL₅₀ para o extrato de 10.687 mg/kg e acima de 20.000 mg/kg para o suco do fruto. Esta dose é 213 vezes maior que a dose utilizada, mostrando uma segurança relativa com relação ao uso desse extrato classificado como não tóxico.

Outros estudos foram realizados utilizando extrato aquoso de *P. edulis* a partir do pericarpo na dose de 300 mg/Kg, que apresentou efeito hipnótico e ansiolítico em camundongos (SENA et al., 2009). Entretanto estudos realizados por Arruda (2015) utilizando a mesma dosagem do extrato aquoso em ratos machos por 30 dias e ratas prenhas durante o período da gestação não demonstrou nenhum parâmetro toxicológico. Dados que ratificam o observado por Devaki et al (2012) que utilizaram extrato aquoso das folhas de *P. edulis* em ratos com doses variantes entre 100 e 400 mg/Kg, e não observaram alterações metabólicas e corpóreas. Em síntese, os dados apresentados neste trabalho, demonstram que o extrato utilizado das folhas de *P. edulis* não apresenta toxicidade, sendo seguro na utilização do tratamento *in vivo*.

Para a realização da avaliação esquistossomicida de uma substância em potencial, faz-se necessário conhecer os parâmetros biológicos do parasito, pois as alterações correlacionadas com a mortalidade são indicativos para este efeito (KATZ, 2008; NOËL, 2008). Com relação ao ensaio esquistossomicida *in vitro*, o EPE demonstrou eficácia nas concentrações de 250 µg/mL e 150 µg/mL, apresentando mortalidade nos tempos respectivos de 48 e 64 horas de cultura, apresentando diferença sobre o grupo do controle negativo, em que permaneceram viáveis após 72

horas. A atividade esquistossomicida do extrato hidroalcólico de *P. edulis* ainda não havia sido relatada na literatura até o presente momento.

Em análise microscópica dos vermes após o ensaio evidenciam possíveis alterações provocadas pelo EPE no tegumento dos vermes de *S. mansoni*, responsável pela absorção de nutrientes, excreção de metabólitos, além de conter proteínas ligadas a resposta imunes dos hospedeiros e ser o campo de interação entre o parasito e ambiente (HOFFMANN et al., 1996; XIÃO et al., 2002; DOENHOFF et al., 2008). A ação do EPE também pode estar associada à sua atividade neurotransmissora e neuromoduladora, pois estudos revelam que dopamina, acetilcolina, epinefrina e alguns aminoácidos: glutamato, γ -ácido aminobutírico (GABA) e aos neuropeptídios da família FMRF-amidas, influenciam na atividade motora do parasito, responsável pela propagação dos movimentos (MARKES; MAULE, 2010; TAMAN; RIBEIRO, 2011; FREZZA, 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

O grupo que não recebeu tratamento (C-) não exibiu alterações no tegumento dos vermes maduros, nem modificações em suas atividades e viabilidades motora, constatando que os efeitos estavam associados ao extrato e sua ação (DE MELO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2020). Contudo, o grupo que recebeu o PZQ como tratamento (C+) obteve letalidade total em até 6 horas, visto que o efeito esquistossomicida prejudica a homeostasia de íons de cálcio ocasionando constantes contrações musculares e lesões no tegumento dos parasitos, acarretando a morte (ALMEIDA et al., 2011; GODINHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2020). Nesse sentido, sugere-se que o EPE tenha a ação esquistossomicida baseada na atuação no sistema neurotransmissor e no tegumento do parasito, uma vez que estas alterações representam alvo de ação dos fármacos esquistossomicidas (FREZZA, 2012).

Considerando a atividade esquistossomicida apresentada pelo extrato a partir do cálculo de CI_{50} , foi então avaliado efeito do EPE sobre a oviposição de *S. mansoni*. A capacidade reprodutiva foi avaliada após exposição do EPE na concentração de 58.02 $\mu\text{g/mL}$, apenas nos casais de vermes que sobreviveram ao tempo de 48 horas. O efeito da dose sub letal de EPE inibiu a postura de ovos assim como o grupo controle positivo (PZQ - 0,5 $\mu\text{g/mL}$), contrapondo o casal do grupo negativo que permaneceu acasalado e o que favoreceu a reprodução. Visando o controle da esquistossomose

esse efeito poderá interferir no ciclo da doença, uma vez que promove a diminuição na eliminação de ovos ou eliminem ovos inviáveis pelo hospedeiro, independente da diminuição da carga parasitária, pois a patogenicidade está relacionada, à presença de ovos, pois estes ficam retidos nos tecidos (GRYSEELS et al., 2006; WILSON et al., 2007). Diante disso, visa a busca por alternativas terapêuticas que possa promover a inibição da oviposição uma vez que o ovo é o principal agente patogênico (KATZ, 2008).

Alguns estudos *in vitro* também evidenciaram alterações utilizando extratos ou compostos vegetais na redução e viabilidade da oviposição de vermes de *S. mansoni*, tais como: extratos das folhas de *Zanthoxylum naranjillo* (BRAGUINE et al., 2009), extratos de semente de *Nigella sativa* L. (MOHAMED et al., 2005), *Curcuma longa* L (MAGALHÃES et al., 2009), composto extraído da *Piper tuberculatum* (DE MORAES et al., 2011), óleos essenciais de *Baccharis trimera* (OLIVEIRA et al., 2012), derivados de floroglucinóis (MAGALHÃES et al., 2010), rizoma de *Zingiber officinale* (SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2002), *Piper crassinervium* e os composto dermaseptina e epiisopiloturina (MORAES, 2011). No presente estudo não foi investigado se o EPE causa alterações nos órgãos reprodutivos dos parasitos. Contudo considerando a redução da oviposição é possível que estes órgãos tenham sofrido alguma lesão capaz de afetar a oogênese e espermatogênese.

Partindo para caracterização química do EPE utilizada no presente estudo, revelou a presença de cinco compostos, sendo os majoritários derivados da Apigenina e Luteolina (ANEXO B). De acordo com Bylka et al (2004), a apigenina possui efeito contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. e promissora anti-*Schistosoma*. Além disso estudos constataram que a luteolina possui atividade antiprotozoária; assim como a combinação de apigenina, campferol, luteolina e quercetina contra o *Plasmodium falciparum in vitro* (Lehane; Saliba, 2008; Wangchuk et al., 2013). Além disso Wong et al (2009) verificaram o efeito sinérgico da quinacrina e um novo dímero da apigenina no tratamento da Leishmaniose.

Ademais Akkari et al (2014) constataram atividade anti-helmíntica do extrato etanólicos de *Artemisia* sp. contra *Haemonchus contortus*, sendo que a análise química desse extrato revelou a presença dos flavonoides luteolina e apigenina. Já Wangchuk et al (2016) evidenciaram que a luteolina derivada de *Ajania nubigena*,

possui atividade anti-helmíntica contra *S. mansoni* e *Trichuris muris*, causando danos no tegumento dos vermes de *S. mansoni* e afetando a cutícula e bandas glandulares de *T. muris*.

Ainda que os flavonoides tenham se destacado em estudos biológicos pela sua diversidade em ações terapêuticas, ainda é desconhecida seus mecanismos de ações, sendo alvo de bastantes estudos (MACHADO et al., 2008). Nosso estudo sugere que a ação anti-*Schistosoma in vitro* do EPE estão associados à luteolina, um dos principais flavonoides encontrado no extrato visto que este já foi relatado que este causa danos do tegumento dos vermes.

A partir dos resultados da ação esquistossomicida *in vitro*, iniciou a avaliação esquistossomicida *in vivo* do EPE isolado e a sua associação com o Praziquantel em camundongos, experimentalmente infectados por *S. mansoni*. Para essa fase, avaliamos parâmetros parasitológicos e histopatológicos.

Primeiramente verificamos os parâmetros parasitológicos, visto que estes são primordiais na seleção dos compostos anti-esquistossomótico e de drogas eficientes capazes de combater helmintos. Neste ensaio *in vivo* verificamos a carga parasitária dos animais que tiveram tratamentos, avaliação quantitativa de ovos retidos no fígado e intestino; quantificação de ovos eliminados pelas fezes e contagens de granulomas no fígado (PELLEGRINO; KATZ, 1968; HOLLAND et al., 1974). No entanto, o grupo que apresentou melhor resultado, foi o que obteve tratamento com associação (EPE+PZQ), havendo redução na quantidade de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes e retidos no tecido hepático e intestinal, quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento (C-).

De acordo com a OMS, a análise da carga parasitária associada a eliminação de ovos nas fezes (WHO, 2014) é determinada de acordo com a quantidade de ovos eliminados nas fezes: refere-se como baixa até 99 ovos por gramas (opg), moderada entre 100 a 399, e alta quando acima de 399 opg. Os grupos tratados com EPE e EPE+PZQ exibiram carga parasitária baixa com opg de fezes variando entre 47 e 96, sendo semelhante ao grupo PZQ, tendo diferença significativa do grupo que não recebeu tratamento (controle negativo, C-), na qual a carga parasitária foi superior a 400 opg por fezes.

Em relação a diminuição de ovos nos tecidos hepático e intestinal dos camundongos infectados tratados com EPE e EPE+PZQ, consideramos o ocorrido devido a ação esquistossomicida *in vitro* do extrato que teve eficácia na redução dos vermes e diminuição da oviposição. Por consequência, ocorrendo diminuição dos vermes e da sua oviposição, reduzirá o número de ovos depositados sobre os tecidos (SECOR, 1996; KAMEL et al., 2006; RODRIGUES, 2019). Ademais, os grupos tratados obtiveram resultados correspondentes ao grupo tratado com PZQ, que também obteve elevada redução do número de ovos de *S. mansoni* nos tecidos.

Em outros estudos, a espécie vegetal *P. edulis* apresentou ação antiprotozoária, atividade giardicida (Neiva et al., 2014) e anti-helmíntico (SANGEETHA et al., 2010).

Na esquistossomose cerca de 40 a 50% dos ovos de *S. mansoni* ficam retidos nos tecidos dos hospedeiros, sobretudo no fígado e intestino, ocasionando reações inflamatórias imunogênica, granulomatosa e fibrótica, acarretando em doença intestinal ou hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004; GRYSEELS et al., 2006; SOUZA et al., 2011). Com a redução da carga parasitária utilizando o EPE e EPE+PZQ, avaliamos os parâmetros histopatológicos no tecido hepático dos animais infectados e dos que obtiv

eram esses tratamentos.

A infecção por *S. mansoni* apresenta inicialmente uma resposta imunológica predominante do tipo 1, correspondente a fase aguda pré-postural, com o início da oviposição há o predomínio de uma resposta do tipo 2 (fase aguda pós-postural). O predomínio Th2 é importante na defesa do hospedeiro, pois a formação do granuloma, limita os antígenos liberados pelos ovos e reduz o dano tecidual (CHUAH et al., 2014; RODRIGUES, 2019). O granuloma é formado pela interação entre célula-célula, e célula-matriz do tecido afetado, e das células recrutadas da circulação. Os linfócitos T CD4+ e B, macrófagos e eosinófilos, em decorrência do estímulo frente à antígenos solúveis dos ovos, modificam a produção e deposição da matriz extracelular heterogênea, que resulta na formação de uma estrutura esférica e compacta, que se organiza ao redor do ovo do parasito (PESCE et al., 2006; LENZI et al., 2008; RODRIGUES, 2019). Por sua vez, a resposta Th2 ao alcança o pico na 8ª semana

pós infecção, é modulada negativamente com a progressão da infecção para a fase crônica (WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007).

A partir do momento que a resposta imunológica é modulada, cogita-se o estabelecido da fase crônica. Os sintomas clínicos da esquistossomose durante essa fase são atribuídos à fibrose relacionada à intensidade da resposta inflamatória granulomatosa induzida por substâncias líticas liberadas pelos ovos do parasito (LENZI et al., 1998; WILSON et al., 2007; ANDRADE, 2009).

O tratamento utilizando PZQ (C+) nos animais infectados não induziu diminuição na quantidade de ovos depositados, porém apresentou uma diminuição na extensão e na formação dos granulomas sobre o tecido hepático, corroborando com a literatura (ZAIA, 2015; RODRIGUES, 2019). Os animais que foram tratados com EPE, apresentaram redução da extensão do granuloma e quantidade de ovos; já os animais tratados com EPE+PZQ, além da diminuição desses parâmetros, apresentaram também, uma menor lesão tecidual quando comparados aos animais infectados tratados ou não com PZQ (C- e C+). Diante disso sugere-se que o EPE potencializou o efeito do fármaco e ambos os tratamentos (EPE e EPE+PZQ) via um efeito anti-inflamatório e hepatoprotetor, reduzindo a atividade granulomatosa inflamatória sobre o tecido.

Estudos tem evidenciado o potencial anti-inflamatório e cicatrizante do EPE (SILVA, et al, 2001; GOMES et al., 2006; VARGAS et al., 2007; BENINCÁ, et al., 2007). No entanto, os compostos majoritários presentes nesse extrato apigenina e luteolina também demonstram ação antiinflamatória, uma vez que podem inibir a óxido nítrico sintase, além de reduzir a ativação do sistema complemento, levando a diminuição de células inflamatórias ao endotélio, ocasionando uma diminuição da resposta inflamatória (FRIESENECKER et al., 1995; MUTOH et al., 2000; RASO et al., 2001; SANDHAR et al., 2011).

Rodrigues et al (2020) demonstraram que o tratamento com extrato de *Dysphania ambrosioides* induziu alterações similares as observadas neste estudo, possivelmente por efeito imunomodulador e anti-inflamatório do extrato. Guimarães et al (2015) relataram melhora na inflamação hepática após o tratamento com alcaloide Epiisopiloturina, que reduziu o diâmetro dos granulomas, sinalizando que tal efeito ocorreu devido a ações imunomoduladoras do alcaloide. Além disso o estudo

realizado por Aires et al (2014) relacionou a diminuição no tamanho do granuloma à Beta-lapachona que possui atividade anti-inflamatória.

Mahamoud et al (2014), em estudo experimental, avaliaram a eficácia do extrato de Própolis isolada e associada ao Praziquantel. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos do nosso estudo em relação a diminuição dos granulomas, pois essa a associação da própolis com o fármaco promoveu a potencialização do efeito anti-esquistossomótico ativo do PQZ, resultando em melhoria em parâmetros histológicos e bioquímicos das alterações associadas à esquistossomose.

Há outros estudos descritos na literatura sobre a associações ligadas ao PQZ no tratamento da esquistossomose, como a associação entre testosterona e praziquantel que resultou o aumento da ação esquistossomicida do último, indicando que o tratamento associado melhorou a resposta terapêutica do praziquantel reduzindo a carga parasitária e aumentando a inviabilidade dos ovos de *S. mansoni* (CÉZAR, 2008). Yepes et al (2015) identificaram que quando o praziquantel é ingerido em conjunto com edelfosina (alquil-lisofosfolípido sintético), o tratamento associado promove uma diminuição considerável na formação de granuloma, e melhora na resposta imune celular, com alterações nos padrões de citocinas.

Desta forma, conhecendo o efeito anti-inflamatório que o EPE e seus componentes majoritários possuem, é provável que o tratamento utilizando a associação EPE+PZQ tenha modulado favoravelmente a resposta imune granulomatosa, tendo um efeito hepatoprotetor, uma vez que houve diminuição das lesões no tecido hepático dos animais, podendo possibilitar melhoras clínicas potencializada pelo extrato. Entretanto, o mecanismo pelo qual os tratamentos agem, produzindo redução dos parâmetros parasitológicos e histológicos, ainda não está definido.

Como o tratamento com EPE e sua associação com o Praziquantel evidenciou redução da carga parasitária faz-se necessário estudos imunológicos complementares, além de fornecer novas perspectivas na investigação de compostos isolados sobre efeitos antiparasitários e imunomoduladores no tratamento da esquistossomose.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados concluímos que o tratamento utilizando o extrato hidroetanólico das folhas de *P. edulis* isolado e associado ao Praziquantel na infecção por *S. mansoni*:

- Apresenta atividade esquistossomicida frente aos vermes adultos de *S. mansoni* e efeito inibitório da oviposição nos testes *in vitro*;
- Reduzem ovos de *S. mansoni* no tecido hepático, intestinal e nas fezes;
- Reduzem a área e a quantidade de granulomas sobre o tecido hepático.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES MV. Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição. Viscosa: A. S. SISTEMAS, 2012. 201p.

ADRIKO M, STANDLEY CJ, TINKITINA B, TUKAHEBWA EM, FENWICK A, FLEMING FM, SOUSA-FIGUEIREDO JC, STOTHARD JR, KABATEREINE N. B. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. *Acta Tropica*, 136: 50-57; 2014.

AGRA MF, FRANÇA PF, BARBOSA-FILHO JM. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.

AIRES AL, XIMENES ECPAZ, BARBOS VX, GÓES AJS, SOUZA VNO, ALBUQUERQUE MCPA. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine*, 21: 261–267; 2014.

AKKARI H, RTIBI K, B'CHIR F, REKIK M, DARGHOUTH MA, GHARBI M. In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Research Communications*, 38: 249-255; 2014.

ALVES RRS, MENDES RODRIGUES JG, TELES-REIS A, ARAÚJO NOGUEIRA R, CORREIA LIMA LICÁ I, SAMPAIO LIRA MG, DA SILVA ALVES R, SILVA-SOUZA N, AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE TJ, SILVA MIRANDA G. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 2020 Dec;147(14):1689-1699. doi: 10.1017/S003118202000181X. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32958090

AMARAL FMM. Potencial giardicida de espécies vegetais: aspectos da etnofarmacologia e bioprospecção. 2007. 346f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

AMARAL, F.M.M.; OLIVEIRA, M. A.; COUTINHO, D. F.; GODINHO, J. W. L.S.; CARTÁGENES, M. S. S.; NEIVA, V. A.; NEIVA NETO, R. R.; BASTOS, W. M. 2021. ESTUDO DE VALIDAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS: o elo entre o saber popular e o fitoterápico. In: *Trajetória e pesquisa nas ciências farmacêuticas*. 1. ed. Ponta Grossa: Atena, p. 32-54, 2021.

AMARAL KB, SILVA TP, DIAS FF, MALTA KK, ROSA FM, COSTA-NETO SF, GENTILE R, MELO RCN. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.

ARAUJO AVP. Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de doses repetidas da fosfoetanolamina sintética. 2018. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.5.2018.tde-15032018-092543. Acesso em: 2020-06-30.

ARAUJO WRM, SILVA RV, BARROS CS, AMARAL FMM. Inserção da fitoterapia em unidades de saúde da família de São Luís, Maranhão: realidade, desafios e estratégias. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade*, v. 9, p. 258-263, 2014.

ARAUJO-JORGE TC, CASTRO SL. orgs. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection, 368; 2000.

ARRUDA ACC. Avaliação da toxicidade subcrônica e reprodutiva do extrato seco de pericarpo de *passiflora edulis* variedade flavicarpa degener em ratos. 2015. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal -RN, 2015.

BALBINO EE, DIAS MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 992 - 1000, 2010.

BENINCÁ JP, MONTANHER AB, ZUCOLOTTI SM, SCHENKEL EP, FRÖDE TS. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, Volume 104, Issue 3, 2007.

BERGQUIST NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends in Parasitology*, 18: 309-314; 2002.

BERGQUIST R, UTZINGER J, KEISER J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: how much longer without a viable alternative? *Infect. Dis. Poverty* 6, 74, 2017.

BERNACCI LC, CERVI AC, MILWARD-AZEVEDO MA, NUNES TS, IMIG DC, MEZZONATO AC. 2015. Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>.

BYLKA W, MATLAWSKA I, PILEWSKI NA. (2004). Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents. *Mylan School of Pharmacy*, 7(2), pp. 24 – 31.

BLAGG W, SCHOEGEL EL, MANSOUR NS, KHALAT GI. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4: 23-28; 1955.

BORELLA JC, RIBEIRO NS, TEIXEIRA JCL, CARVALHO, DMA. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.9, n.2, p. 25-36, 2012.

BOROS DL, WARREN KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Experimental Medicine*, 132 (3): 488-507; 1970.

BRAGUINE CG, COSTA ES, MAGALHÃES LG, RODRIGUES V, DA SILVA FILHO AA, BASTOS JK, SILVA ML, CUNHA WR, JANUÁRIO AH, PAULETTI PM. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Z. Naturforsch. C*, v. 64, p. 793-797, 2009.

BRANDÃO MGL, PIGNAL M, ROMANIUC S, GRAEL CFF, FAGG CW. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). *Journal Ethnopharmacology*, 143 (2), 488-500; 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVISA nº 90 de 12 de março de 2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, 12 mar. 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas. 4. Ed. Brasília: Ministério da saúde, 2014. 144p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. 1. ed. Brasília: Anvisa, 2016. 115p.

_____. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011.

_____. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira. 6 ed. v. 2. Brasília, 2019.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 05 abr. 2010a

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Anvisa RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 2 de junho de 2014a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução SVS nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, 29 maio 2003.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, 22 jun. 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. 1.ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRITO, M. C. A. Farmacovigilância em Fitoterapia: controle de qualidade do mesocarpo de *Attalea Speciosa* Mart. ex Spreng. (babaçu). 2015. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2015.

BROOKER S, CLEMENTS AC, BUNDY DA. Global epidemiology and control of soiltransmitted helminth infections. *Advances in Parasitology*, 62: 103-105; 2009.

BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 31 (4): 163-176; 2009.

BUTROUS G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Global Cardiology Science and Practice*, 5: 1-44; 2019.

CAFFREY CR. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11: 433–439; 2007.

CANTANHEDE SPD, FERNANDEZ MA, MATTOS AC, MONTRESOR LG, SILVASOUSA N, THIENGO SC. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, na endemic área for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I – qualitative study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 447 (1): 79-85; 2014.

CARVALHO GBF. Novos antígenos de *Schistosoma mansoni* para o diagnóstico sorológico da infecção ativa e controle de cura. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 459-484.

CERVI AC. 1997. Passifloraceae from Brazil. *Studies of genus Passiflora* L., subgenus *Passiflora*. *Fontqueria*, 45: 1-92 (in Portuguese, with abstract in English).

CÉSAR, Fernanda Andrade. Associação de testosterona e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansonii experimental. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

CHABARIBERI RAO, POZZI ACS, ZERAIK ML, YARIWAKE JH. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHEEVER AW. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide Digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ*, 39 (2): 328-31; 1968.

CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology*, 30 (3): 141-150; 2014.

COELHO AA, OLIVEIRA SEM, RESENDE ED, THIÉBAUT JTL. Dimensionamento amostral para caracterização da qualidade pós-colheita do maracujá amarelo. *Revista Ceres*, 58:23-28. 2011.

COELHO AA, CENCI AS, RESENDE ED. Rendimento em suco e resíduos de maracujá em função do tamanho dos frutos em diferentes pontos de colheita para o armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.13, p.55-63, 2011.

COLLEY DG, SECOR WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.

CORRÊA-JUNHO C. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. / Cirino Corrêa Junior, Mariane Christina Scheffer. – Curitiba: Instituto Emater, 52 (88); 2013.

COSTA NC. Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana in vitro do extrato das sementes de *Passiflora Edulis* Sims e formulações farmacêuticas. Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, 2016.

CRABTREE JE, WILSON RA. *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural examination of pulmonary migration. *Parasitology*, v. 92, p. 343–54, 1986.

CRISCIONE CD, VALENTIM CLL, HIRAI H, LOVERDE PT, TIMOTHY AJC. Genomic linkage map of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Genome biology*, v. 10, n. 6, p. R71, 2009.

CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRICIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 148–154, 2007.

DE MELO NL, MAGALHAES LG, CARVALHO CE, WAKABAYASHI KA, AGUIAR GP, RAMOS RC, MANTOVANI AL, TURATTI IC, RODRIGUES V, GROppo M, CUNHA WR, VENEZIANI RC, CROTTI AE. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Molecules*, 16 (1): 762-773; 2011.

DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986 May 22;89(2):271-7. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6. PMID: 3486233.

DEVAKI K, BEULAH U, AKILA G, GOPALAKRISHNAN VK. Effect of aqueous extract of *Passiflora edulis* on biochemical and hematological parameters of Wistar Albino rats. Toxicol. Int., v.19, p.63-67, 2012.

DHAWAN K, DHAWAN S, SHARMA A. *Passiflora*: a review update. J. Ethnopharmacol. v.94, 2004. p.1-23.

DOENHOFF MJ, CHIODINI PL, HAMILTON JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? Trends Parasitology, 20: 35- 39; 2004.

DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives of schistosomiasis. Current Opinion in Chemical Biology, 21: 659-667; 2008.

DURAND P, SIRE C, THÉRON A. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. Mol Ecol. 2000;9(7):997- 8.

ESCOBAR LK. 1988. Passifloraceae. In: PINTO, P. & LOZANO, G. (Eds.) Flora de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, v.10 (?), 138p.

FALEIRO GF, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

FENWICH A, WEBSTER JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. Current Opinion in Infectious Diseases, 19: 577-582; 2006.

FERREIRA FT, FIDELIS TA, PEREIRA TA, OTONI A, QUEIROZ LC, AMÂNCIO FF, ANTUNES CM, LAMBERTUCCI JR. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni infection and evaluation of morbidity in a low-endemic area in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, n. 3, p. 358–364, 2017.

FREZZA TF. Ação de *Cordia verbenacea* sobre *Schistosoma mansoni*. 2012. Tese (Doutorado em Biologia, área de Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012.

FRIESENECKER B, TSAI AG. INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. Int. J. Microcirc. Clin., v. 15, p. 17-21, 1995.

GBD (Global Burden of Disease). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause and cause-specific mortality for 249

causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388: 1459-1544; 2016.

GENEROSO AL. CONSERVAÇÃO E CULTIVO in vitro DE EMBRIÕES DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims). Universidade Estadual Do Norte Fluminense. Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. 2018.

GENTILE R, SOARES MS, BARRETO MGM, GONÇALVES MML, D'ANDREA PS. The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil. In: ROKNI, M. B. (Ed.) *Schistosomiasis*. Rijeka: InTech. p. 231-254, 2012.

GERKEN SE. Efeitos da alimentação e da densidade populacional sobre o crescimento, a sobrevivência e a fecundidade de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). 1977. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

GOMES CS, CAMPOS ACL, TORRES OJM, VASCONCELOS PRL, MOREIRA ATR, TENÓRIO SB, TÂMBARA EM, SAKATA K, MORAES JR H, FERRER ALS. Efeito do extrato de *Passiflora Edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cir Bras*. [periódico na Internet] 2006;21 Suppl 2:7-14. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/acb/a/9PkPtqHM56qqzpWk9JLb7JF/?lang=pt> >.

GONÇALVES MC. Farmacologia em fitoterapia: comércio e controle de qualidade de produtos vegetais adquiridos em estabelecimentos farmacêuticos no município de São Luís, estado do Maranhão. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2016.

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human Schistosomiasis. *Lancet*, 368: 1106-1118; 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. *Infectious Diseases Clinics of North American*, 26 (9541): 383-397; 2012.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology*, 4 (89): 1-8; 2013.

HOFFMANN WA, PONS JA, JANER JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Journal of Public Health*, 9: 283-91; 1934.

HOLLAND JC, PELLEGRINO J, COZINELLI F. Infection of mice with cercariae, schistosomula of *S. mansoni* by intravenous and subcutaneous routes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16: 132-4; 1974.

HORIUCHI A, SATOU T, AKAO N, KOIKE K, FUJITA K, NIKAIDO T. The effect of free and polyethylene glycoliposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, 129: 83-87; 2005.

IMIG DC. Estudo taxonômico da família Passifloraceae Juss. No Distrito Federal, Brasil. 2013. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

INGALE AG, HIVRALE AU. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. And their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, v. 4, n. 10, p. 417-426, 2010.

JAMIESON BGM. *Schistosoma: biology, pathology, and control*. CRC Press, p. 37, 2016.

JAMIR TT, SHARMA HK, DOLUI AK. 1999. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. *Fitoterapia* 70:395-401.

JARNE P, POINTIER JP, DAVID P. Biosystematics of *Biomphalaria* spp. with an Emphasis on *Biomphalaria glabrata*. p. 1-32. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. *Biomphalaria Snails and Larval Trematodes*. Springer, 2011. 141p.

KAMEL EG, EL-EMAM M, MOSTAFA B, MAHMOUD S, BAYAUMY FA. Studies on combination of some environmental factors in relation to the infectivity of *S. mansoni* cercariae to albino mice. *The 4th International Conference on Biological Sciences*, 1: 207-217; 2006.

KATO T, MIURA M. On the comparison of some stool examination methods. *Japanese Journal of Parasitology*, 3: .35; 1954.

KATZ N, ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, 55 (1):38-43; 2003.

KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 14: 397- 400; 1972.

KLOOS H, CORREA-OLIVEIRA R, REIS DC, RODRIGUES EW, MONTEIRO LA, GAZZINELLI A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (4): 578-586; 2010.

KRAUTZ-PETERSON G, NDEGWA D, VASQUEZ K, KORIDECK H, ZHANG J, PETERSON JD, SKELLY PJ. Imaging schistosomes in vivo. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 8, p. 2673–2680, 2009.

LAMBERTUCCI JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 4, p. 422–435, 2010.

LAPA AJ, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MTR, LIMA TCM. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES COM, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 7.ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2016. p.247-262.

LAWTON SP, HIRAI H, IRONSIDE JE, JOHNSTON DA, ROLLINSON D. (2011). Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites & Vectors* 4, 131.

LEHANE AM, SALIBA KJ. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res Notes* 1, 26 (2008). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-2>.

LEITE AA, MENEZES-RODRIGUES FS, ERRANTE PR. Infecções Parasitárias e Alterações Imunológicas em Pacientes com Imunodeficiência Comum Variável. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa* v. 14, n. 36, jul./set. 2017 ISSN 2318-2083 (eletrônico).

LENZI H, ROMANHA WDS, MACHADO M, MOTA E, LENZI J. Patologia Experimental com enfoque no granuloma esquistosomótico. Coelho PMZ (Org), Lenzi HL (Org). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*, Rio de Janeiro, Fiocruz, 561-654; 2008.

LENZI HL, JURBERG AD, COELHO PMZ, LENZI JA. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

LOPES AJO. Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do pólen coletado por abelhas sem ferrão: estudos in silico, in vitro e in vivo. Tese - Ciências da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2020.

LORENZI H, MATOS FJA. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. 2. ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LUNA LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258,

LUTZ AO. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 121-155; 1919.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MACIEL MA, PINTO AC, VEIGA J R, GRYNBERG NF, ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, p.429 - 438, 2002.

MAGALHAES LG, MACHADO CB, MORAIS ER, MOREIRA EB, SOARES CS, DA SILVA SH, DA SILVA FILHO AA, RODRIGUES V., 2009. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research* 104, 1197-1201.

MAGALHAES LG, KAPADIA GJ, DA SILVA TONUCI LR, CAIXETA SC, PARREIRA NA, RODRIGUES V, DA SILVA FILHO AA. 2010. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research* 106, 395-401.

MAHMOUD TY, RIZK SM, MAGHRABY AS, SHAHEEN AA. (2014). Propolis enhances the effectiveness of praziquantel in experimental schistosomiasis: biochemical and histopathological study. *Parasitology research*, 113(12), 4513-4523.

MALEK EA. Snail Hosts of Schistomiasis and other Snail Transmitted Diseases in Tropical América. In: BARBOSA, F. S. Tópicos de Malacologia Médica – Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 300-310; 1985.

MARKS NJ, MAULE AG. Neuropeptides in helminths: occurrence and distribution. *Advances Experimental Medicine Biology*, 692: 49-77; 2010.

MARTINS AV, MARTINS G, BRITO RS. Wild reservoirs of the *Schistosoma mansoni* in the State of Minas Gerais. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 7: 259–265; 1955.

MARTINS FL, CARVALHO FLO, COSTA DM, RODRIGUES WPR, FRAGA FV, PARIS LRP, JUNIOR LRG, BUENO DMP, DAVID ML. Fatores de risco e possíveis causas de esquistossomose. *Revista Saúde em Foco*, 11: 396-404; 2019.

MARTINS JPM. Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni* (SmDHFR). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2017.

MARTINS MC, GARLET TMB. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. Santa Maria, v. 20, n. 1, jan.-abr. 2016, p. 438–448.

MARTINS-MELO FR, PINHEIRO MC, RAMOS ANJr, ALENCAR CH, BEZERRA FS, HEUKELBACH J. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000–2011. *International Journal for Parasitology* 44, 1055–1062, 2014.

MASSUD FILHO J. Medicina Farmacêutica: conceitos e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MCMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, ZHOU XN. Schistosomiasis (Primer). *Nature Reviews: Disease Primers*, 2018.

MELETI LMM. Avanços na cultura do maracujá no brasil. rev. Bras. frutic., Jaboticabal, Volume Especial, E. 083-091, Outubro, 2011.

MENDES RJA. Análise temporal e espacial da esquistossomose mansoni no estado do Maranhão no período de 2007 a 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Saúde e Ambiente /CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2019.

MENDONÇA AMB, FEITOSA APS, VERAS DL, MATOS-ROCHA TJ, CAVALCANTI MG, BARBOSA CCG, BRAYNER FA, ALVES LC, 2016. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 58, 1-6. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658007>

MESQUITA LSS. Estudo de revisão e prospecção biotecnológica das espécies *Passiflora alata* CURTIS e *Passiflora edulis* SIMS. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2019.

MIGLIATO KF, CORRÊA MA, SALGADO HRN, TOGNOLLI JO, SACRAMENTO LVS, ELLO JCP, GIANNINI MJSM, ALMEIDA AMF, PIZZOLITTO AC. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Química Nova, v.34, n.4, p. 695-699, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Doenças tropicais negligenciadas. Número Especial | Mar. 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, LIRA MGS, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Monitoring positivity for *Schistosoma mansoni* in rodents *Holochilus* sp. naturally infected. Ciência Animal Brasileira, 16 (3): 456–463; 2015.

MIRODDI M CALAPAI G, NAVARRA M, MINCIULLO PL, GANGEMI S. *Passiflora incarnata* L. ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. Journal of Ethnopharmacology, v.150, n.3, p.791–804, 2013.

MONTANHER AB, ZUCOLOTTO SM, SCHENKEL EP, FRÖDE TS. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. Journal of Ethnopharmacology. Volume 109, Issue 2, 2007.

MONTEIRO GKM, PIMENTEL GRS, CARVALHO HBS, SILVA JAM, SILVA JES, NASCIMENTO CEC. PERFIL DA MORTALIDADE POR ESQUISTOSSOMOSE NO MARANHÃO. Anais da XXVI Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão/ VI Congresso Maranhense de História da Medicina. UFMA, SÃO LUÍS/MA, 2018.

MORAES J, NASCIMENTO C, LOPES PO, NAKANO E, YAMAGUCHI LF, KATO MJ, KAWANO T. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of pipartine. Experimental Parasitology, 127 (2): 357-364; 2011.

MOHAMED AM, METWALLY NM, MAHMOUD SS. Sativa seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 74: 257-264; 2005.

MOLGAARD P, NIELSEN SB, RASMUSSEN DE, DRUMMOND RB, MAKAZA N, ANDREASSEN J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 257-264; 2001.

MORAES J. Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MORAES VS, SHOLLENBERGER LM, SIQUEIRA LMV, BORGES WC, HARN DA, QUEIROZ E, GRENFELL RF, RABELLO ALT, COELHO MZ. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 114: 1-12; 2019.

MOREIRA DL, TEIXEIRA SS, MONTEIRO MHD, DE-OLIVEIRA ACCAX, PAUMGARTTEN FJR. Traditional use and safety of herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 248-257, 2014.

MUTOH M, TAKAHASHI M, FUKUDA K, KOMATSU H, ENYA T, MATSUSHIMA-HIBIYA Y, MUTOH H, SUGIMURA T, WAKABAYASHI K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.* v. 91, p. 686-91, 2000.

NDAMBA J, NYAZEMA N, MAKAZA N, ANDERSON C, KAONDERA KC. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 42: 125-132; 1994.

NEGRÃO-CORRÊA D, SOUZA DG, PINHO V, BARSANTE MM, SOUZA AL, TEIXEIRA MM. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity*, 72: 1135-1142; 2004.

NEIVA VA, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF, CARTÁGENES MSS, MORAES DFC, AMARAL MM. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2014, v. 24, n. 02 [Accessed 8 May 2021], pp. 215-224. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.004>>. ISSN 1981-528X.

NEUWINGER HD. *African Traditional Medicine: a Dictionary of Plant Use and Applications*. With Supplement: Search System for Diseases: Medpharm, Stuttgart, Germany. 2000.

NEVES DP, MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA. *Parasitologia Humana*. 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. 616 p.

NOËL F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* e

esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 823-847.

NOYA O, KATZ N, POINTIER JP, THERON A, DE NOYA BA. Schistosomiasis in America. In *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*, 11-43. Springer; 2015.

OLIVEIRA RN, REHDER VLG, OLIVEIRA ASS, JÚNIOR IM, CARVALHO JE, RUIZ ALTG, JERALDO VLS, LINHARES AX, ALLEGRETTI SM. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Experimental Parasitology*, 2012.

PARAENSE WL. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ CS, BARUZZI RG, SIQUEIRA W. editors. *Introdução à geografia médica do Brasil*. São Paulo: Edgar Blucher e Universidade de São Paulo, p. 213-239, 1972.

PARAENSE WL. Estado atual de sistemática do planorbídeos. *Arquivo museu nacional*, 55: 105-128; 1975.

PARAENSE WL. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (4): 357-362; 2004.

PARAENSE WL. The schistosome vectores in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 7-16; 2001.

PATRICIO KP, MINATO AC, LOPES MA, BROLIO AF, BARROS GR, MORAES VS, BARBOSA GC. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE: Revisão Integrativa. *Cien Saude Colet* [periódico na internet] (2021/Fev). Disponível em: <http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/o-uso-de-plantas-medicinais-na-atencao-primaria-a-saude-revisao-integrativa/17949?id=17949>. Acesso em: 20.05.2021.

PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, 2: 499-511; 2002.

PELLEGRINO J, KATZ N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Advances in Parasitology*, 41: 233-290; 1968.

PEREIRA WS, RIBEIRO BP, SOUSA AI, SERRA IC, MATTAR NS, FORTES TS. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 602-5; 2010.

PLANTS DATABASE. *Passiflora edulis* Sims, 2019. Disponível em: <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=PAED>. Acesso em: 20.03.2021.

RABELLO A. diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92 (5): 669-676.

RASO GM, MELI R, DI CARLO G, PACILIO M, DI CARLO R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001 Jan 12;68(8):921-31. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00999-1. PMID: 11213362.

REY L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. *Research and Reviews in Parasitology*, 53 (1-2): 13-25; 1993.

REY L. *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nas Américas e na África*. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. 888 p.

RODRIGUES KAF, AMORIM LV, OLIVEIRA JMG, DIAS CN, MORAES DFC, ANDRADE EHA, MAIA JGS, CARNEIRO SMP, CARVALHO FAA. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-Leishmania agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, v. 2013, p. 279726, 2013.

RODRIGUES-FRAGOSO L, REYES-ESPARZA J, BRUCHIEL SW, HERRERARUIZ D, TORRES E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.227, p.125-135, 2008.

RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAÚJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORRÊA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. *J Ethnopharmacol.* 2021 Jan 10;264:113287. doi: 10.1016/j.jep.2020.113287. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32858197.

ROJAS J, RONCEROS S, PALOMINO R, TOMÁS G, CHENGUAYEN J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *Anales de La Facultad de Medicina de Lima*, v. 67, f. 3, p. 206- 213, 2006.

RUDNICKI M. Propriedade Antioxidante de Extratos de *Passiflora alata* Dryander de *Passiflora edulis* Sims. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SANDERSON L, BARTLETT A, WHITHIELD PJ. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and the egg production. *Journal of Helminthology*, 76: 241-247; 2002.

SANDHAR, HK, KUMAR B, PRASHER S, TIWARI P, SALHAN M, SHARMA P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1. 25-41.

- SANTOS AM, MELO ACF. L. Schistosomiasis prevalence in Tutóia village, Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1): 97-99; 2011.
- SANTOS M.B, SANTOS AD, SILVA PP, BARRETO AS, SANTOS EO, FRANÇA AVC, BARBOSA CS, ARAÚJO KCGM. Spatial analysis of viral hepatitis and schistosomiasis coinfection in an endemic area in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(3):383-387, 2017.
- SECOR WE. Pattern of oogram and ovacount in infected mice with *S. mansoni*. *Journal of Infectious Diseases*, 174: 1131; 1996.
- SCHOLTE RG, GOSONI L, MALONE JB, CHAMMARTIN F, UTZINGER J, VOUNATSOU P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica*, 132: 57-63; 2014.
- SENA LM, ZUCOLOTO SM, REGINATTO FH, SCHENKEL EP, LIMA TCM. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine*, v.234, p.967-975, 2009.
- SILVA APS, NASCIMENTO SLC, MARTINS FCS, ARAÚJO JM, CORREIA MTS, CAVALCANTI, MSL. Atividade Antimicrobiana VLM e Análise Fitoquímica de Extratos Orgânicos de *Cleome spinosa* Jacq. *Frente. Microbiol.* 2016, 7, 963.
- SILVA AGS. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907. 71f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual do Maranhão, 2012.
- SILVA BTF, NUNES SFLC, FREIRE SMF. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracujá-amarelo). *Cad Pesq.* 2001;12:28-37.
- SILVA MAB. Controle da qualidade de fitoterápicos: proposta de bula e metodologia para o controle de qualidade físico-químico de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Trabalho de conclusão de curso (TCC) - Universidade de Brasília, 54 p. Brasília, 2015.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR.(Orgs). *Farmacognosia do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre, Editora: Artmed, 2017.
- SIQUEIRA-BATISTA R, RAMOS JÚNIOR AN, FARINAZZO RJM. O *Schistosoma mansoni*. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al, (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr: 26-32, 1998.
- SMITHERS SR, TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worm. *Parasitology*, 55: 695-700; 1965.

SOUZA NBM. Composição química e atividade antioxidante de maracujá-roxo (*Passiflora edulis Sims edulis*) em diferentes graus de maturação. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança, 2016.

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, JÚNIOR FCF, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 9 (4): 300-7; 2011.

STEINMANN P, KEISER J, BOS R, TANNER M, UTZINGER J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, 6 (7): 411–25; 2006.

STEINAUER ML, BLOUIN MS, CRISCIONE CD. Applying evolutionary genetics to schistosome epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2010;10(4):433-43.

TAMAN A, RIBEIRO P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176: 42-50; 2011.

TAYLOR SC. Photoaging and pigmentary changes of the skin. In: Burgess CM. *Cosmetic dermatology*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin; 2005. p. 29-49.

TAYLOR L. *Maracuja Herbal Secrets of the Rainforest*. Prime publishing inc, Austin. 1996.

TEIXEIRA CF, NEUHAUSS E, BEM R, ROMANZINI J, GRAEFF-TEIXEIRA C. Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1:e73; 2007.

TRACY JW, WEBSTER LTJr. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoniase, tripanossomíase, leishimaniose, e outras infecções causadas por protozoários. In: Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. *Passiflora alata* Curtis, 2018. Disponível em: <www.tropicos.org/Name/24200280>. Acesso em 26 de abril de 2019.

ULMER T, MACDOUGAL JM. *Passiflora: passionflower of the world*. Cambridge: Timber Press, 2004.

VALE TC, SOUSA-PEREIRA SR, RIBAS JG, LAMBERTUCCI JR. Neuroschistosomiasis mansoni. *The Neurologist*, v. 18, n. 6, p. 333–342, 2012.

VAN LIESHOUT L, POLDERMAN AM, DEELDER AM. Immunodiagnosis of Schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Tropica*, 77: 69–80; 2000.

VANDERPLANK J. Passionflowers. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press. 224p. 2000.

VARGAS AJ, GEREMIAS DS, PROVENSÍ G, FORNARI PE, REGINATTO FH, GOSMANN G, SCHENKEL EP, FRÖDE TS. Passiflora alata and Passiflora edulis spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy, Fitoterapia, Volume 78, Issue 2, 2007, Pages 112-119, ISSN 0367-326X.

VEIGA-BORGEAUD T, LEMOS-NETO RC, PETER F, BASTOS OC. Constatações sobre a importância dos roedores silvestres (*Holochilus brasiliensis nanus*. Thomas, 1981) na epidemiologia da esquistossomose própria da Pré-Amazônia. Caderno de Pesquisa, 2 (1): 86-99; 1986.

VIANA AP, SILVA FHL, GONÇALVES GM, SILVA MGM, FERREIRA RT, PEREIRA TNS, PEREIRA MG, AMARAL JÚNIOR AT, CARVALHO GF. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 16: 250-253.

UTZINGER J, KEISER J, SHUHUA X, TANNER M, SINGER BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47: 1487-1495; 2003.

VERJEE MA (2019) Schistosomiasis: still a cause of significant morbidity and mortality. Research and Reports in Tropical Medicine 10, 153–163.

VITORINO RR, SOUZA FPC, COSTA AP, FARIA-JÚNIOR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Revista Brasileira de Clínica Médica, 10 (1): 39-45; 2012.

WANGCHUK P, KELLER PA, PYNE SG, KORTH J, SAMTEN TAWEECHOTIPATR M, RATTANAJAK R, KAMCHONWONGPAISAN S. Antimicrobial, antimalarial and cytotoxicity activities of constituents of a Bhutanese variety of *Ajania nubigena*. Nat Prod Commun. 2013b; 8: 733–736.

WANGCHUK P, PEARSON MS, GIACOMIN PR, BECKER L, SOTILLO J, PICKERING D, SMOUT MJ, LOUKAS A. (2016) Compounds Derived from the Bhutanese Daisy, *Ajania nubigena*, Demonstrate Dual Anthelmintic Activity against *Schistosoma mansoni* and *Trichuris muris*. PLoS Negl Trop Dis 10(8): e0004908. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004908>

WARREN KS. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: in vivo models. Immunological Reviews, 61: 189-213; 1982.

WATT JM, BREYER-BRANDWIJK MG. 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. Edinburg, Livingston, pp. 826–830.

WEERAKOON KGAD, GOBERT GN, CAI P, MCMANUS DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (4): 939–967; 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 26 de Abril de 2021.

WHO, World Health Organization. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, p. 18-19 August 2008, 2009.

_____. World Health Organization. Schistosomiasis fact sheet 115. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>

_____. World Health Organization. Investing to overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Geneva, 2015. 191 p.

_____. World Health Organization. Schistosomiasis: Situation and trends, 2017.

_____. World Health Organization. Schistosomiasis: Fact sheet. 2018. https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1 > Acesso em 10 de dezembro de 2020.

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

WYNN TA, THOMPSON RW, CHEEVER AW, MENTINK-KANE MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201: 156–167; 2004.

WOLMARANS CT, DE KOCK KN, STRAUSS HD, BORNMAN M. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *Journal of Helminthology*, 76 (3): 273-277; 2002.

WONG ILK, CHAN KF, ZHAO Y, CHAN TH, CHOW LMC. (2009). Quinacrine and novel apigenin dimer can synergistically increase the pentamidine susceptibility of the protozoan parasite *Leishmania*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 1179–1190.

Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, Muro A, Mollinedo F. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jul 20;9(7):e0003893. doi: 10.1371/journal.pntd.0003893. PMID: 26191954; PMCID: PMC4507859.

ANEXO A

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFMA

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA CIAEP: 02.0341.2019			
Comissão de Ética no Uso de Animais				
<u>CERTIFICADO</u> *09/2020*				
Certificamos que a proposta intitulada: "INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907", Processo n. 23115.002254/2020-18, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21/02/2020.				
We certify that the proposal: "PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION IN INFECTED MICE BY <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907", Process n. 23115.002254/2020-18, under the responsibility of Prof. Dr. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/21/2020.				
Finalidade da Proposta: Pesquisa Área: Ciências da Saúde				
Vigência da Proposta: 01/08/2020 à 01/08/2024.				
<i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>				
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão			
Espécie	Camundongos <i>Mus musculus</i>	Sexo Idade Peso	Macho 60 a 90 dias 20-25g	Amostra 316
Linhagem/Raça: Swiss				
Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.				
São Luís, 28 de abril de 2020.				
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA				



ANEXO – B

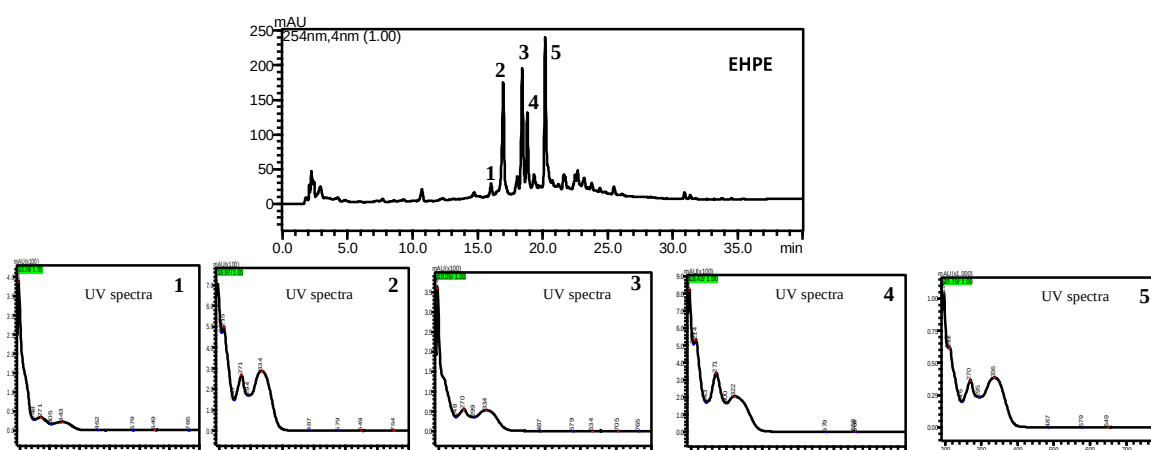
RELATÓRIO DE ANÁLISE

Condições Cromatográficas

Utilizou-se um sistema HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba quaternária (LC-20AT), detector PDA (SPD-M20A) e dagaiseficador de membrana (DGU-20As). A coluna utilizada foi Luna 5 μm C18 100 A, Phenomenex (150 μm x 4,6 μm). Os solventes de eluição utilizados foram A (água +0.01% de ácido fórmico) e B (metanol0.01% de ácido fórmico). As amostras foram eluidas de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 100% de B em 30 min e 100% de B até 40 min. O fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura ambiente. O volume de injeção da amostra foi de 10 μL . Os dados foram recolhidos e processados utilizando o software LC Solution (Shimadzu) e comparados com padrões autênticos.

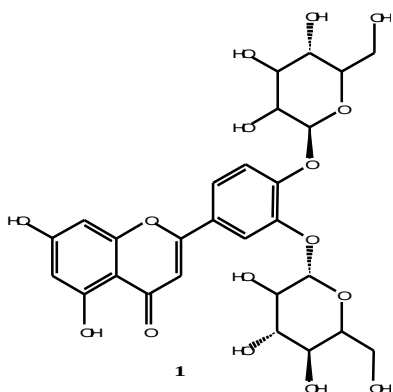
Perfil por HPLC-PDA e os espectros na região do UV

Extrato de *Passiflora edulis*

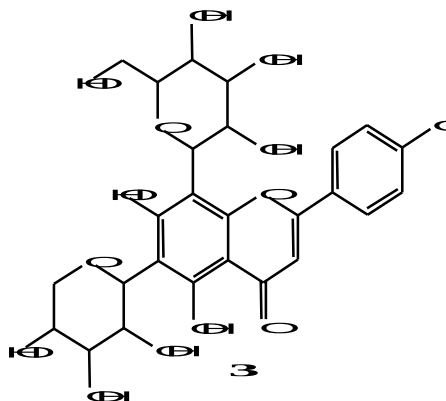


Estrutura dos compostos majoritários presentes no extrato de *Passiflora edulis*

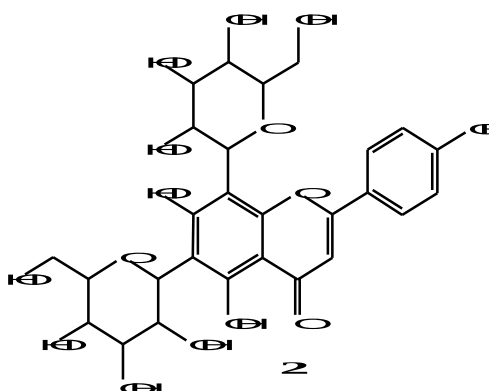
Luteolin 3',4'-diglucoside (**1**)



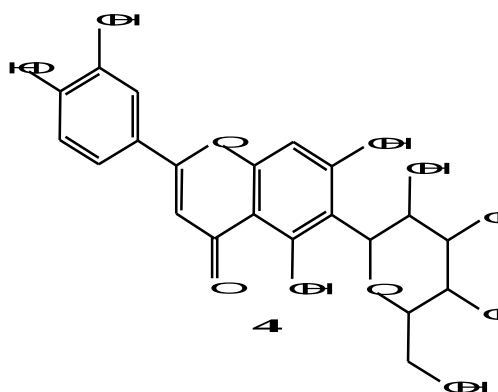
Apigenin-6-C-arabinoside-8-C-glycoside (**3**)



Vicenin (**2**)



Isoorientin (**4**)



Isovitexin (**5**)

