

LUDMILA NAKAMURA RAPADO

**Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados
de *Piper* em modelos biológicos para o controle da
esquistossomose mansônica**

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

São Paulo
2012

LUDMILA NAKAMURA RAPADO

Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Profa. Dra. Toshie Kawano (*in memoriam*)
Profa. Dra. Eliana Nakano

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rapado, Ludmila Nakamura.

Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica / Ludmila Nakamura Rapado. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Nakano.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção e controle da esquistossomose mansônica.

Versão do título para o inglês: Obtention and evaluation of *Piper* compounds in biological models to schistosomiasis mansoni control.

1. Esquistossomose mansoni 2. Composto moluscicida 3. *Piper*
4. Compostos ativos 5. Fracionamento biomonitorado 6. Toxicidade
I. Nakano, Profa. Dra. Eliana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0112/2012

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

Candidato(a): Ludmila Nakamura Rapado.

Título da Tese: Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

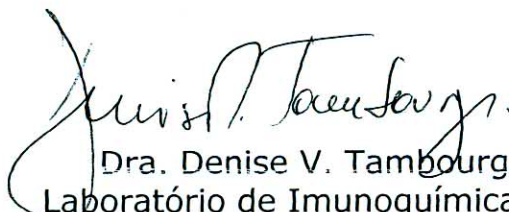
São Paulo, 13 de dezembro de 2007.

Dra. Toshie Kawano e Ludmila Nakamura Rapado
Laboratório de Parasitologia e Malacologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Atividade de extratos de Piperaceae em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica". ["Activity of Piperaceae extracts in a models on schistosomiasis control"].

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido, CEUAIB **434/07**, é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,


Dra. Denise V. Tambourgi
Laboratório de Imunoquímica
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

A minha família com carinho.

A Ana Julia e Ana Laura na esperança de que um dia acreditem na ciência.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Toshie Kawano, por ter orientado meus caminhos durante toda a pós-graduação, pela oportunidade de ter conhecido seu trabalho, seu laboratório e sua forma de acreditar no ser humano.

A Dra. Eliana Nakano, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, por ter aceitado orientar este trabalho a partir de 2010 e permitir sua conclusão, por acreditar neste estudo, pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi, do Laboratório de Química e Produtos Naturais da USP, pela orientação nos estudos de isolamento e identificação dos compostos deste estudo, por terem possibilitado minha permanência no LQPN e me incentivarem sempre a ir adiante.

Aos Profs. Drs. Cristina Northfleet de Albuquerque, Dominique Corinne Hermine Fischer e Ronaldo Zucatelli Mendonça pelas contribuições no exame de qualificação.

A Profa. Dra. Sueli Ivone Borrelly do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN pela colaboração nos estudos de toxicidade.

Aos Profs. Drs. Carlos Alberto de Bragança Pereira do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo e Marcus Tullius Scotti da Universidade Federal da Paraíba por realizarem as análises estatísticas e de quimiometria.

A todos os colegas do Laboratório de Química e Produtos Naturais da USP pelo constante auxílio, incentivo e acolhimento em todos os momentos. Obrigada pelo carinho!

Aos amigos que conheci no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan: Alessandro, por acompanhar os ensaios de toxicidade e sempre estar disposto a conversar sobre nossos estudos; a Ana Rita, Cristina, Lenita e Patrícia, “velhas” companheiras de caminhada, obrigada pelo constante apoio e Pati, obrigada por fornecer os parasitos e auxiliar nos estudos de atividade esquistossomicida; as “novas” companheiras Amanda por ajudar na finalização e impressão da tese, Rafaela por desenhar as estruturas químicas da tese, Marcela e Rebeca por

suas opiniões e contribuições no decorrer do estudo; a Priscila, por durante sua iniciação científica contribuir no desenvolvimento dos estudos com embriões de *B. glabrata*. Ao Fábio por ser meu companheiro de laboratório e de vida!

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, por todo o tempo de convívio, aprendizado e companhia. Obrigada e sentirei saudades!

“Não há saber mais ou menos. Há saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

RAPADO, L. N. **Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica.** 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A esquistossomose é uma doença parasitária incidente em países tropicais e subtropicais, onde pelo menos 240 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 779 milhões estão em situação de risco de infecção. O uso de moluscicidas é considerado um método adequado para prevenir a infecção de pessoas em contato com águas em áreas de risco; todavia, atualmente não há disponibilidade de um moluscicida viável. Estudos de bioprospecção em Piperaceae identificaram espécies de *Piper* potencialmente ativas em *Biomphalaria glabrata*. O objetivo deste estudo foi buscar compostos presentes em espécies de *Piper* ativos em *B. glabrata* adultos e embriões e avaliar a atividade esquistossomicida em miracídios e cercárias de *S. mansoni* e a toxicidade em *Daphnia similis* e *Danio rerio* do composto mais ativo. Para isso, foram empregadas duas abordagens experimentais: primeiramente, partiu-se de uma espécie ativa de *Piper*, porém sem o perfil químico conhecido; alternativamente, foram selecionados compostos com base na representatividade no gênero *Piper* ou alguma indicação de atividade moluscicida. Os compostos ativos foram obtidos a partir do fracionamento biomonitorado de *Piper diospyrifolium*, que resultou no isolamento e identificação de dois compostos com atividade moluscicida: a flavocavaína A, isolada pela primeira vez nesta espécie e o ácido 4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil] benzoico, de estrutura química inédita. A busca de compostos moluscicidas também foi realizada em amidas, por ser o grupo mais representativo entre os compostos isolados de *Piper* e em chalconas, uma vez que o fracionamento biomonitorado de *P. diospyrifolium* identificou a flavocavaína A como ativa em *B. glabrata*. Dos oito compostos avaliados neste estudo (2',4',6'-trihydroxidihydrochalcona, dihydroflavocavaína C, flavocavaína A, 4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil] benzoico, pelitorina, piperina, peperlonguminina e piplartina), quatro foram ativos em *B. glabrata* em concentrações recomendadas pela OMS para moluscicidas de origem vegetal (2',4',6'-trihydroxidihydrochalcona, flavocavaína A, ácido 4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil] benzoico e piplartina). Destes, a amida piplartina foi ativa em *B. glabrata* adultos e embriões em menores concentrações e por isso as atividades esquistossomicida e a toxicidade foram avaliadas. A piplartina não causou letalidade em concentrações inferiores a 20 ppm em miracídios e cercárias de *S. mansoni*, contudo causou alterações na mobilidade de ambos os organismos em todas as concentrações avaliadas. A piplartina foi classificada como tóxica em *D. similis* e *D. rerio*, contudo ainda foi menos tóxica que a niclosamida, único moluscicida disponível comercialmente. Neste estudo, os compostos moluscicidas foram obtidos a partir do fracionamento biomonitorado de *P. diospyrifolium* e por meio da avaliação da atividade de compostos do grupo das amidas e chalconas isoladas de *Piper*; ambas as metodologias foram adequadas para a obtenção de compostos ativos. Além desses dois métodos, a análise de componente principal (PCA) também mostrou ser uma ferramenta viável para a busca de compostos ativos em espécies com perfil químico descrito. Este trabalho foi o primeiro a realizar o fracionamento biomonitorado e utilizar a quimiometria para a obtenção de compostos com atividade moluscicida.

Palavras-chave: Esquistossomose mansônica. Compostos moluscicida. *Piper*. Obtenção de compostos ativos. Fracionamento biomonitorado. Toxicidade.

ABSTRACT

RAPADO, L. N. **Obtention an evaluation of *Piper* compounds in biological models to schistosomiasis mansoni control.** 2012. 141 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Schistosomiasis is an endemic parasitic disease affecting at least 240 million people with more than 779 million at risk of infection. The use of molluscicides has been considered an appropriate method to prevent human infection in hazard areas; however, there is no viable molluscicide available. Studies on Piperaceae bioprospecting identified *Piper* species potentially active in *Biomphalaria glabrata*. The aim of this study was to search for compounds in *Piper* species active in *B. glabrata* adults and embryos stages and to evaluate schistosomicidal activity in miracidia and cercariae of *S. mansoni* and toxicity of the most active compound in *Daphnia similis* and *Danio rerio*. The active compounds were obtained from *Piper diospyrifolium* bioguided fractionation, which resulted in isolation and identification of two molluscicidal compounds: the flavokavain A, isolated in this species for the first time and the 4-hydroxy-3-[3,7, trimetildodeca-11-2 ,6,10-trienil] benzoic acid, a novel chemical structure. The search for active compounds was carried out in amides, as the most representative group of *Piper* compounds, and chalcones, since the bioguided fractionation of *P. diospyrifolium* has identified flavokavain A as active in *B. glabrata*. Of the eight compounds evaluated in this study (2', 4', 6'- trihydroxydihydrochalcone, dihydroflavokavain C, flavokavain A, 4-hydroxy-3-[3,7,11- trimetildodec-2 ,6,10-trienyl] benzoic acid, pelitorin , piperine, peperlonguminine and piplartine), four were active in concentrations recommended by WHO for molluscicides (2', 4', 6'- trihydroxydihydrochalcone, flavokavain A, 4-hydroxy-3-[3,7,11- trimetildodec-2 ,6,10-trienyl] benzoic acid and piplartine. Piplartine amide was the most active in *B. glabrata* adults and embryos, being, therefore the selected compound for evaluation of schistosomicidal activity toxicity. There was no mortality of miracidia and cercariae exposed to piplartine in concentrations below 20 ppm; however changes in the mobility of both organisms at all concentrations were observed. Piplartine was classified as toxic to *D. similis* and *D. rerio*; nevertheless it was less toxic than niclosamide, the only commercially available molluscicide. In this study, molluscicidal compounds were obtained from bioguided fractionation of *P. diospyrifolium* and by evaluating the activity of amides and chalcones from *Piper*. Both methods were suitable to obtain active compounds. In addition, principal component analysis (PCA) was performed and also proved to be a viable tool for the screening of active compounds in species with described chemical profile. This study was the first to perform the bioassay-guided fractionation and to use chemometrics to obtain molluscicidal compounds.

Keywords: Schistosomiasis mansoni. Molluscicidal compounds. *Piper*. Active compound. Bioguided fractionation. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição global das esquistossomoses.....	16
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil.....	17
Figura 3 - Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil.....	18
Figura 4 - <i>Biomphalaria glabrata</i>	19
Figura 5 - Estádios embrionários de <i>B. glabrata</i>	20
Figura 6 - Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	22
Figura 7 - Descrição química e molecular da niclosamida.....	25
Figura 8 - Estrutura química dos primeiros compostos com atividade moluscicida.....	26
Figura 9 - Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i>	29
Figura 10 - <i>Piper tuberculatum</i>	31
Figura 11 - <i>Piper diospyrifolium</i>	33
Figura 12 - Porcentagem de ocorrência dos metabólitos secundários em <i>Piper</i>	34
Figura 13 - Animais utilizados nos ensaios de atividade biológica e toxicidade.....	54
Figura 14 - Metodologia utilizada para a avaliação da atividade moluscicida dos extratos/frações/compostos.....	56
Figura 15 - Metodologia utilizada para a avaliação da atividade moluscicida.....	57
Figura 16 - Ilustração da metodologia utilizada no ensaio de toxicidade aguda em <i>Danio rerio</i>	60
Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato metanólico de folhas de <i>P. diospyrifolium</i> ..	65
Figura 18 - Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico de folhas de <i>P. diospyrifolium</i>	66
Figura 19 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração B biomonitorado em <i>B. glabrata</i>	67
Figura 20 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração C biomonitorado em <i>B. glabrata</i>	67
Figura 21 - Cromatograma da fração C4.....	68
Figura 22 - Cromatograma da fração C10 – 14.....	69
Figura 23 - Fluxograma do isolamento da flavocavaína A e do ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)benzoico.....	70
Figura 24 - Estrutura química e dados moleculares da flavocavaína A.....	71

Figura 25-	Estrutura do 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico.....	71
Figura 26-	Mortalidade de <i>B. glabrata</i> adultos expostos a flavocavaína A.....	74
Figura 27-	Mortalidade de <i>B. glabrata</i> adultos expostos a chalcona 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona.....	75
Figura 28-	Embriões de <i>B. glabrata</i> exposto a 15 ppm de 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona.....	75
Figura 29-	Mortalidade de embriões de <i>B. glabrata</i> expostos chalcona 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona.....	76
Figura 30-	Mortalidade de <i>B. glabrata</i> adultos expostos ao ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico.....	77
Figura 31-	Mortalidade de <i>B. glabrata</i> adultos expostos a hidroquinona.....	78
Figura 32-	Mortalidade de embriões de <i>B. glabrata</i> expostos a hidroquinona.....	79
Figura 33-	Mortalidade de <i>B. glabrata</i> adultos expostos a piplartina.....	85
Figura 34-	Embriões de <i>B. glabrata</i> expostos a piplartina.....	86
Figura 35-	Mortalidade de embriões em estágio de blástula expostos a piplartina.....	87
Figura 36-	Mortalidade de embriões em estágio de gástrula expostos a piplartina.....	87
Figura 37-	Mortalidade de embriões em estágio de trocófora expostos a piplartina.....	87
Figura 38-	Mortalidade de embriões em estágio de véliger expostos a piplartina.....	88
Figura 39-	Gráfico de scores e loadings de PCA de <i>P. tuberculatum</i>	90
Figura 40-	Gráfico de scores e loadings de PCA de <i>P. tuberculatum</i>	91
Figura 41-	Valores calculados e preditos das CL ₅₀ de <i>P. tuberculatum</i> em <i>B. glabrata</i> ...	92
Figura 42-	Scores e weights plot gerados pela análise de PLS de <i>P. tuberculatum</i> em <i>B. glabrata</i>	93
Figura 43-	Miracídeos de <i>S. manosni</i> expostos a piplartina.....	94
Figura 44-	Cercárias de <i>S. manosni</i> expostos a piplartina.....	95
Figura 45-	Alterações morfológicas em <i>D. rerio</i> causadas por 48 horas de exposição a piplartina.....	97

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 -	Atividade moluscicida em <i>Biomphalaria</i> e toxicidade de alguns compostos.....	27
Quadro 2 -	Composição química e atividades biológicas de <i>Piper tuberculatum</i>	32
Quadro 3 -	Alguns compostos de <i>Piper</i> e suas atividades biológicas/farmacológicas.....	34
Quadro 4 -	Amidas isoladas de <i>Piper</i> e suas atividades biológicas e farmacológicas.....	40
Quadro 5 -	Espécies de <i>Piper</i> com atividade moluscicida em <i>B. glabrata</i>	43
Quadro 6 -	Espécies, partes das plantas e tipos de extração dos extratos avaliados em <i>B. glabrata</i>	49
Quadro 7 -	Descrição e origem dos compostos avaliados em <i>B. glabrata</i>	50
Tabela 1 -	Atividade em <i>B. glabrata</i> das espécies <i>P. aduncum</i> , <i>P. crassinervium</i> , <i>P. cuyabanum</i> , <i>P. diospyrifolium</i> e <i>P. hostmannianum</i>	64
Tabela 2 -	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da flavocavaína A e do ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico.....	72
Tabela 3 -	Atividade em <i>B. glabrata</i> das chalconas, ácido benzoico e quinona.....	79
Tabela 4 -	Valores das CL ₅₀ e CL ₉₀ da população de <i>B. glabrata</i> expostos a flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico e hidroquinona.....	82
Tabela 5 -	Atividade moluscicida em <i>B. glabrata</i> de amidas isoladas de <i>Piper</i>	83
Tabela 6 -	Valores das CL ₅₀ e CL ₉₀ da população de <i>B. glabrata</i> expostos a piplartina.	86
Tabela 7 -	Número de <i>B. glabrata</i> mortos após exposição a extratos metanólicos de raiz, caule, folhas e frutos de <i>P. tuberculatum</i> e valores de CL ₅₀	89
Tabela 8 -	Mortalidade de <i>D. similis</i> e <i>D. rerio</i> expostos a piplartina e niclosamida.....	96
Tabela 9 -	Toxicidade da piplartina e niclosamida para <i>D. similis</i> e <i>D. rerio</i>	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 As esquistossomoses.....	16
1.2 A esquistossomose mansônica.....	17
1.3 Parasito e hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica.....	18
<i>1.3.1 Biologia do hospedeiro intermediário.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2 Estádios embrionários do hospedeiro intermediário.....</i>	<i>20</i>
1.4 Ciclos de vida do <i>S. mansoni</i>.....	21
1.5 Breve histórico das estratégias de controle da esquistossomose.....	22
1.6 Usos de moluscicida no controle do caramujo <i>Biomphalaria</i>.....	24
<i>1.6.1 Moluscicidas de origem vegetal.....</i>	<i>25</i>
1.7 Famílias Piperaceae.....	29
<i>1.7.1 O gênero <i>Piper</i>.....</i>	<i>30</i>
<i>1.7.1.1 <i>Piper tuberculatum</i>.....</i>	<i>30</i>
<i>1.7.1.2 <i>Piper diospyrifolium</i>.....</i>	<i>33</i>
<i>1.7.2 Fitoquímica e potencial biológico de <i>Piper</i>.....</i>	<i>33</i>
<i>1.7.2.1 Amidas.....</i>	<i>39</i>
<i>1.7.2.2 Ácidos benzóicos e derivados.....</i>	<i>39</i>
<i>1.7.2.3 Chalconas e flavanonas.....</i>	<i>39</i>
1.8 Obtenções de compostos com atividade moluscicida em espécies de <i>Piper</i>	41
1.9 Estudos da toxicidade dos compostos ativos.....	43
2 OBJETIVOS.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Espécies vegetais e compostos.....	48
<i>3.1.1 Seleção das espécies de <i>Piper</i> e dos compostos isolados.....</i>	<i>51</i>
3.2 Obtenção dos extratos.....	51
<i>3.2.1 Avaliação da atividade moluscicida dos extratos.....</i>	<i>51</i>
3.3 Fracionamento biomonitorado de <i>P. diospyrifolium</i> em <i>B. glabrata</i>.....	52
<i>3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>52</i>
<i>3.3.2 Cromatografia em coluna aberta (CC).....</i>	<i>52</i>
<i>3.3.3 Cromatografia em camada delgada preparativa e analítica.....</i>	<i>53</i>
3.4 Monitoramento das frações de <i>P. diospyrifolium</i>.....	53
3.5 Identificação estrutural dos compostos ativos.....	53

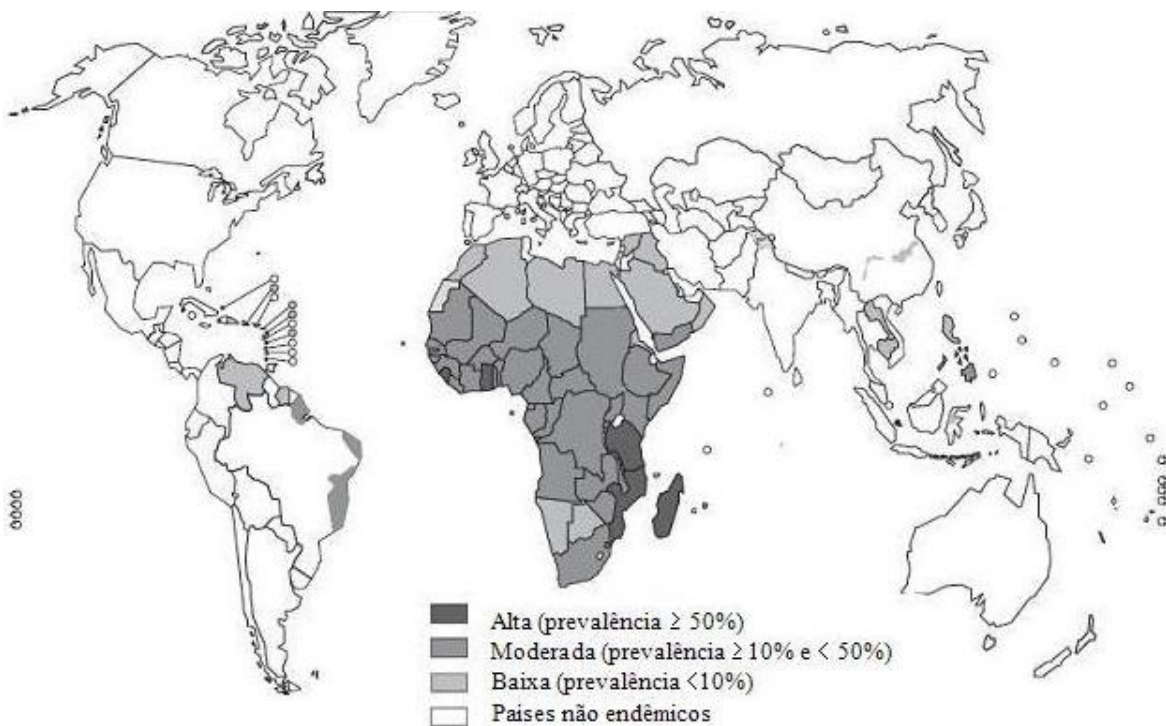
3.6 Solventes e reagentes.....	53
3.7 Animais utilizados nesse estudo.....	54
3.8 Ensaio biológico.....	55
<i>3.8.1 Avaliação da atividade moluscicida em B. glabrata adultos.....</i>	<i>55</i>
<i>3.8.2 Avaliação da atividade moluscicida em embriões de B. glabrata.....</i>	<i>56</i>
<i>3.8.3 Determinação das CL₉₀ e CL₅₀ da população em B. glabrata.....</i>	<i>57</i>
<i>3.8.4 Avaliação da atividade esquistossomicida do composto mais ativo.....</i>	<i>57</i>
3.9 Avaliação da toxicidade do composto mais ativo.....	58
<i>3.9.1 Toxicidade em microcrustáceo.....</i>	<i>58</i>
<i>3.9.2 Toxicidade em vertebrado.....</i>	<i>59</i>
3.10 Análises estatísticas.....	60
<i>3.10.1 Análise quimiométrica.....</i>	<i>60</i>
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Fracionamento biomonitorado, isolamento e identificação de compostos.....	63
<i>4.1.1 Seleção da espécie P. diopyrifolium para a busca de compostos.....</i>	<i>63</i>
<i>4.1.2 Análise cromatográfica do extrato bruto.....</i>	<i>63</i>
<i>4.1.3 Fracionamento biomonitorado de P. diopyrifolium em B. glabrata.....</i>	<i>66</i>
<i>4.1.4 Identificação estrutural dos compostos ativos.....</i>	<i>71</i>
<i>4.1.5 Avaliação da atividade moluscicida das chalconas, ácido e quinona.....</i>	<i>73</i>
4.2 Atividades moluscicida, esquistossomicida, toxicidade de amida de Piper.....	83
<i>4.2.1 Avaliação da atividade moluscicida de amidas de Piper.....</i>	<i>83</i>
<i>4.2.2 Análise quimiométrica de PCA e PLS.....</i>	<i>88</i>
<i>4.2.3. Avaliação da atividade esquistossomicida da piplartina.....</i>	<i>93</i>
<i>4.2.4. Avaliação da toxicidade da piplartina.....</i>	<i>95</i>
5 DISCUSSÃO.....	98
6 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE A - Perfil cromatográfico das frações obtidas.....	123
APÊNDICE B - Cromatograma das frações obtidas.....	124
APÊNDICE C - Espectros de RMN de ¹H e ¹³C.....	155
APÊNDICE D - Atividade moluscicida de análogos da piplartina e amidas.....	157

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 As esquistossomoses

As esquistossomoses são doenças parasitárias endêmicas em 76 países com prevalência em áreas tropicais e subtropicais (Figura 1). Estima-se que pelo menos 240 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 779 milhões em situação de risco de infecção devido ao difícil acesso à água potável, ausência de saneamento básico e contato com água contaminada por meio da agricultura, trabalho doméstico e lazer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Figura 1 - Distribuição global das esquistossomoses no ano de 2009 de acordo com os níveis de prevalência de cada país.



Fonte: WHO (2011).

As esquistossomoses mansônica, japônica e hematóbica são as mais disseminadas, possuem helmintos do gênero *Schistosoma* como agentes etiológicos e são transmitidas por moluscos gastrópodes que habitam coleções hídricas na África, extremo Oriente, Pacífico ocidental e nas Américas (REY, 2008). No Brasil, bem como nas Américas, apenas a esquistossomose mansônica é prevalente.

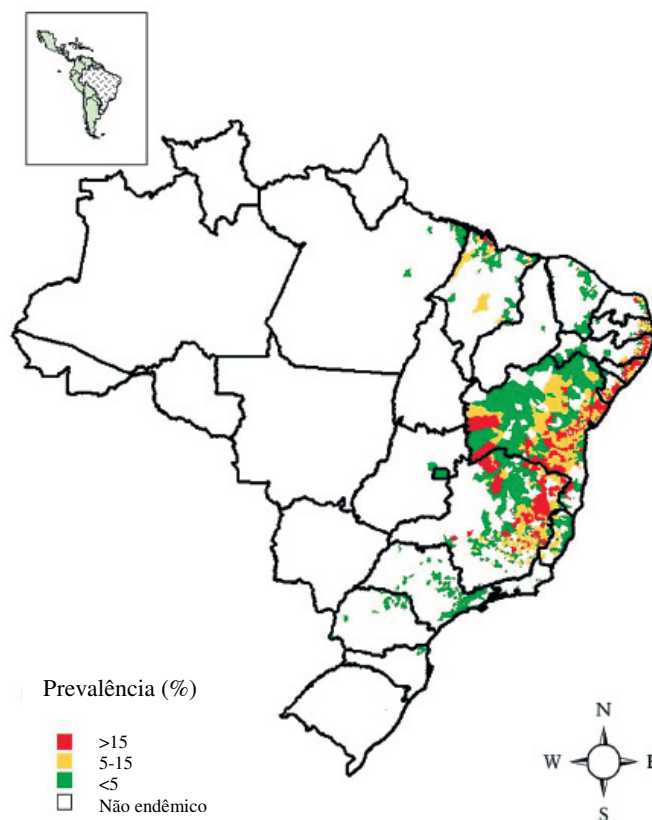
1.2 A esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica ocorre em 54 países, principalmente na América do Sul, região do Caribe, África e leste do Mediterrâneo (CHITSULO et al., 2000).

No Brasil a doença foi registrada pela primeira vez por Pirajá da Silva, na Bahia em 1908 (COURA; AMARAL, 2004). Hoje é um problema de saúde pública com prevalência estimada entre 6 a 8 milhões de pessoas infectadas e 30 milhões expostas ao risco de infecção (Figura 2) (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2008).

Como observado no mapa abaixo, os índices de prevalência mais elevados ocorrem em municípios dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Minas Gerais e a distribuição focal da doença ocorre nos estados do Pará, Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil, de acordo com o nível de prevalência dos municípios.



Fonte: Amaral et al. (2006).

1.3 Parasito e hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica é causada pelo *Schistosoma mansoni*, trematódeo digenético, que, quando adulto, vive nos vasos sanguíneos do sistema porta hepático do homem e de alguns mamíferos roedores e marsupiais (REY, 2008).

Os hospedeiros intermediários do parasito pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria*. Das 10 espécies de *Biomphalaria* registradas, apenas *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1838) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) são suscetíveis à infecção natural por *S. mansoni* (REY, 2008).

Figura 3 – Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil.



Fonte: Carvalho et al. (2008).

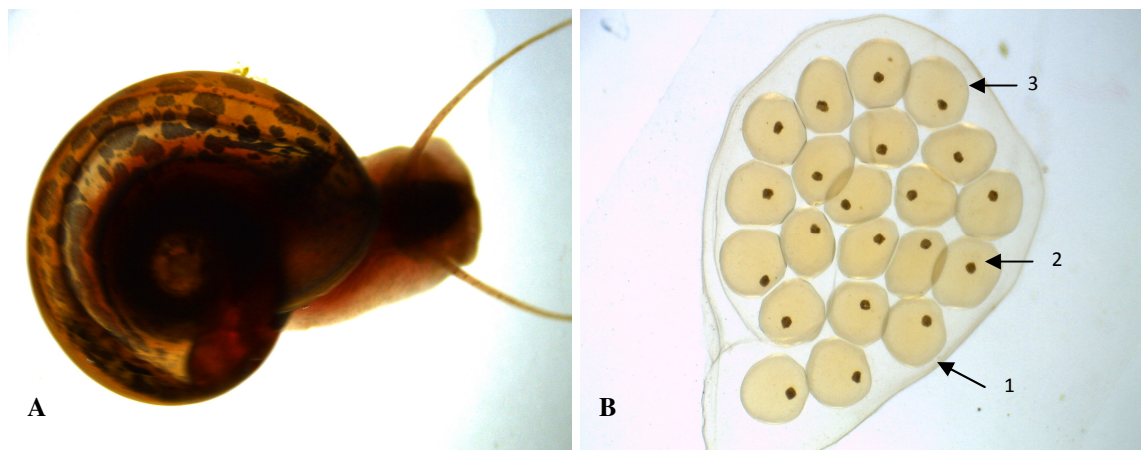
Caramujos *Biomphalaria* habitam água doce com pouca ou nenhuma correnteza como represas, lagos, lagoas, córregos, riachos, alagados, brejos, açudes, valas, valetas de irrigação de hortas e outros. O território brasileiro possui numerosas coleções hídricas colonizadas pelo hospedeiro da esquistossomose (Figura 3).

B. glabrata é a mais importante espécie hospedeira intermediária do *S. mansoni* nas Américas e sua distribuição está quase sempre associada às áreas onde ocorre a doença (CARVALHO et al., 2008).

1.3.1 *Biologia do hospedeiro intermediário*

Caramujos *Biomphalaria* (Figura 4A) são hermafroditas, capazes de se reproduzir por autofecundação, mas a fecundação cruzada resulta em maior número de descendentes (REY, 2008). Os ovos são postos um a um e envoltos por uma substância gelatinosa transparente, que forma uma cápsula amarelada denominada desova (Figura 4B). Estas são ovipostas, principalmente, sob folhas de plantas aquáticas submersas e o número de ovos de uma desova pode variar de 1 a mais de 100. A eclosão em condições de laboratório e a 25 °C inicia-se, normalmente, 7 dias após a postura e com cerca de 30 dias, os caramujos podem alcançar a maturidade sexual e começar a desovar, podendo um só indivíduo produzir aproximadamente 10 milhões de descendentes (SOUZA; LIMA, 1990).

Figura 4 – *Biomphalaria glabrata* A- adulto com aproximadamente 12 mm de diâmetro de concha e B- desova com 21 embriões em estágio de blástula, 1- cápsula, 2- embrião e 3- membrana do ovo.



Fonte: Rapado (2012).

1.3.2 Estádios embrionários do hospedeiro intermediário

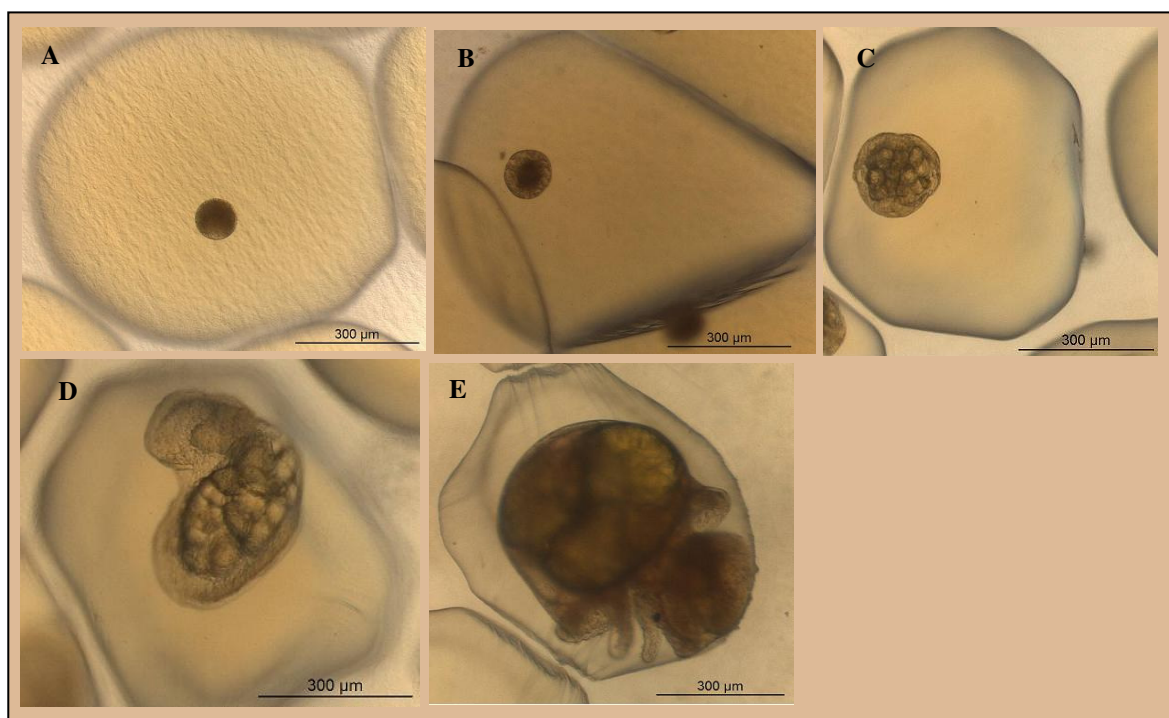
Baseado nos estudos de Camey e Verdonk (1970), Kawano, Okazaki e Ré (1992) e Kawano et al. (2004) segue a descrição dos principais eventos que ocorrem no desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*.

O ovo inicialmente sofre diversas clivagens até alcançar o estágio de blástula, que ocorre aproximadamente entre a 10^a a 23^a hora da primeira clivagem. Nesse estágio ocorrem apenas mitoses, sem aumento de volume celular (Figura 5A).

No estágio seguinte, de gástrula, que ocorre de 24 a 39 horas após a 1^a clivagem, o embrião sofre um achatamento na região do polo vegetativo em direção ao polo animal e ocorre o início de movimentação celular (Figura 5B).

O estágio de trocófora ocorre entre as 40^a e 80^a horas após a 1^a clivagem. Nessa fase, ocorre a organogênese. Uma dupla fileira celular situada na região anterior à boca forma o prototroco, o qual é constituído por um cinturão de cílios que permitem a movimentação do embrião (principal característica desse estágio) (Figura 5C).

Figura 5 - Estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata* A- blástula, B- gástrula, C- trocófora, D- véliger e E- hipoestádio (pré-eclosão). Imagens obtidas em microscópio estereoscópico.



Fonte: Rapado (2012).

O estágio de véliger ocorre entre as 80ª e 120ª horas após a primeira clivagem. Há um desenvolvimento maior da concha e do pé, formação dos olhos, aumento do tamanho dos tentáculos, a concha inicia o enrolamento e cobre todo o corpo; o caramujo possui formação quase completa (Figura 5D).

O hipostádio ocorre após as 120ª horas da primeira clivagem e caracteriza-se pela formação completa do embrião e início da eclosão (Figura 5E).

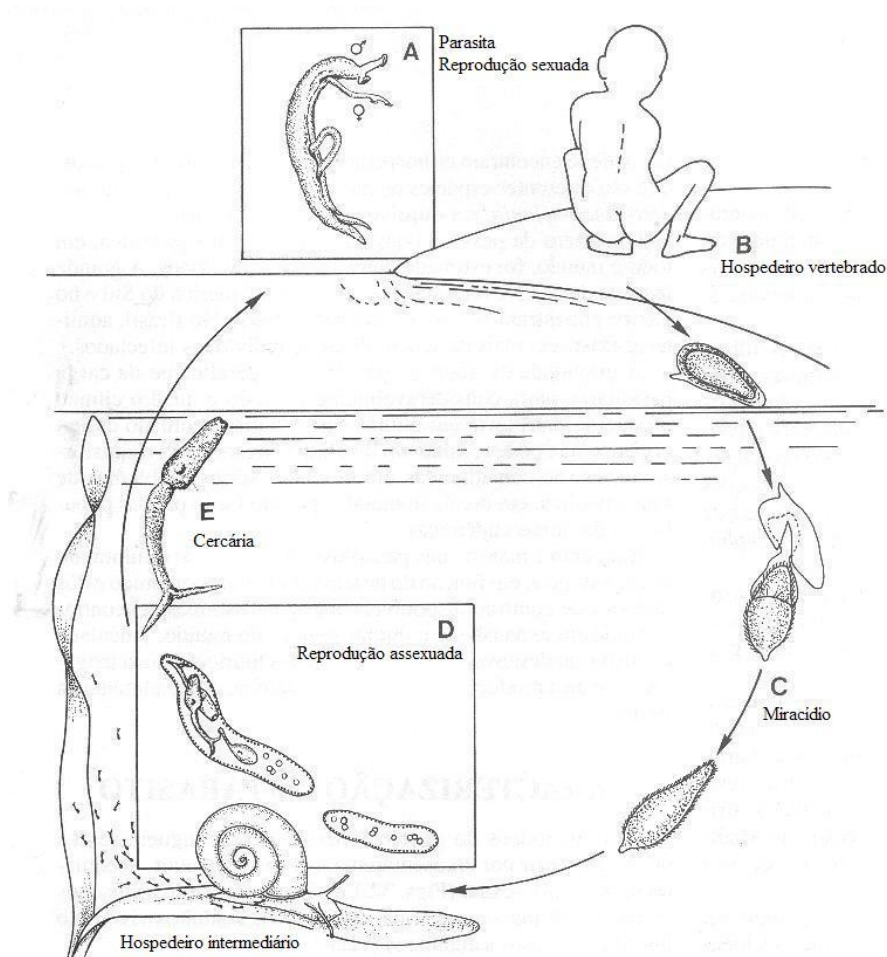
O conhecimento da embriologia de *Biomphalaria* pode servir de base para estudos de toxicidade. Esses caramujos são bons bioindicadores de efeitos teratogênicos, pois além de terem seu desenvolvimento embrionário bem descrito apresentam vantagens como a transparência das cápsulas da desova e dos ovos e postura em monocamada que facilita a identificação dos efeitos morfogenéticos de substâncias diversas sobre os embriões (KAWANO, 1983; KAWANO; SIMÕES, 1987; KAWANO; OKAZAKI; RÉ, 1992; NAKANO et al., 2003; TALLARICO et al., 2004).

1.4 Ciclo de vida do *S. mansoni*

O ciclo do *S. mansoni* é heteroxeno envolvendo um hospedeiro intermediário, caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, e um hospedeiro definitivo vertebrado, sendo o homem o principal.

O ciclo se estabelece quando um indivíduo portador da esquistossomose mansônica defeca e libera em suas fezes ovos de *S. mansoni*. Em contato com a água, os ovos eclodem e os miracídeos, fase livre nadante do parasito, se locomovem até encontrar caramujos do gênero *Biomphalaria*, onde penetram pelo tegumento. No interior do caramujo, por reprodução assexuada, os miracídeos transformam-se em esporocistos primários e secundários; posteriormente em cercárias de cauda bifurcada. As cercárias, fase infectante do parasito, por estímulo de luz e calor, saem do caramujo e nadam à procura do hospedeiro vertebrado; neste penetram ativamente através da pele e perdem a cauda. Após a penetração, as cercárias dão origem a esquistossômulos que são arrastados para o coração e pulmões, de onde migram até o fígado. Ao chegar no sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos desenvolvem-se até a fase adulta. Os vermes adultos machos e fêmeas acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal. As fêmeas podem eliminar até 300 ovos por dia; uma parte dos ovos fica retida nos tecidos do fígado e paredes do intestino, originando granulomas e outra parte (cerca de 22% dos ovos) chega à luz intestinal sendo eliminada com as fezes estabelecendo o ciclo da doença no ambiente (Figura 6) (REY, 2008; SOUZA; LIMA, 1990).

Figura 6 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* A- Parasitos adultos, B- Indivíduo portador da esquistossomose defecando próximo a um rio, C- Liberação do miracídio, D- Reprodução assexuada e formação da fase infectante do parasito, E- Liberação de cercária, fase infectante do parasito.



Fonte: Rey (2008).

1.5 Breve histórico das estratégias de controle da esquistossomose mansônica

Desde a década de 1950, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem recomendado sucessivas estratégias para o controle da esquistossomose em escala global (WHO, 1953, 1961, 1965, 1967, 1973, 1980, 1985, 1993, 2002). Devido à dificuldade de controlar a transmissão da doença, as estratégias variaram desde a década de 50 até os dias de hoje.

Inicialmente, em 1950, dentre as medidas para o controle da esquistossomose, duas foram prioritárias: a descoberta de moluscicidas com atividade prolongada e restrita às espécies-alvo em baixas concentrações, de impacto ambiental mínimo, baixo custo e fácil

aplicação e a descoberta de drogas quimioterápicas eficazes e seguras. Já na década de 60 o combate dos hospedeiros intermediários foi reconhecido como a medida isolada mais efetiva no controle da esquistossomose, uma vez que nenhum fármaco ou outras medidas de controle eram promissoras.

Em 1970 a OMS relatou que o tratamento dos doentes, associado ao controle dos caramujos proporcionava resultados mais rápidos sobre a incidência, prevalência e intensidade da transmissão quando comparado ao uso de moluscidas como única medida de controle. Contudo, a importância do uso de moluscida foi reiterada, bem como recomendado o desenvolvimento de novos compostos moluscidas e o aperfeiçoamento das técnicas de aplicação visando um máximo efeito e mínimo custo.

Na década de 80, devido ao desenvolvimento de métodos diagnósticos quantitativos simples e rápidos, bem como o investimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de drogas eficazes e seguras, com destaque para o praziquantel; houve uma mudança na abordagem do controle da esquistossomose, e a OMS passou a colocar o hospedeiro humano como centro de atenções no controle da transmissão da doença e a aplicação de moluscidas passou a ser uma medida auxiliar no controle da esquistossomose. Em 1985, a diminuição da morbidade foi o objetivo dos programas de controle e a partir da década de 2000 o controle da esquistossomose passou a ser realizado de forma integrada aos das geo-helminthíases, com o tratamento dos grupos de alto risco sem diagnóstico individual prévio. Devido à ausência de moluscidas eficazes, o uso desse método de controle deixou de ser priorizado, porém é utilizado até os dias de hoje em locais de alta endemicidade por ser considerada a única medida eficaz para a redução da transmissão da doença em curto prazo (CARVALHO et al., 2008).

Apesar das mudanças de prioridade quanto às medidas de controle adotadas pela OMS, a esquistossomose ocupa o segundo lugar no ranking das enfermidades com maior área de endemismo e prevalência no mundo (CHITSULO et al., 2000), sendo evidente a necessidade do desenvolvimento e implantação de medidas de controle eficazes. Contudo, é sabido que nenhum método isolado é capaz de controlar a transmissão da doença, sendo necessária uma associação de medidas de controle, as quais devem ser mantidas por longo prazo, o que encarece e muitas vezes inviabiliza a implantação do programa de controle (COURA, 1995; COURA-FILHO et al., 1994; JURBERG et al., 1989; REY, 2008; SOUZA; LIMA, 1990). Atualmente segundo Fenwick e Savioli (2011) a implantação de programas integrados de tratamento dos doentes com o fármaco praziquantel e o uso de moluscida ainda é a melhor opção para controle da esquistossomose.

1.6 Uso de moluscicida no controle do caramujo *Biomphalaria*

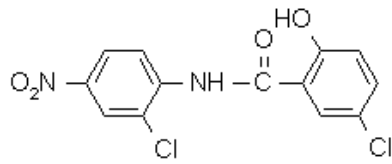
Caramujos *Biomphalaria* desempenham um papel importante na transmissão da doença, pois em seu interior ocorre a multiplicação e formação da fase infectante do *S. mansoni*. Estratégias que envolvam seu controle são prioritárias para a redução da transmissão da esquistossomose mansônica, pois além de ser o organismo mais vulnerável no ciclo de transmissão, sua eliminação previne a infecção de pessoas em contato com águas em áreas de risco (CAMARA et al., 2008; LARDANS; DISSOUS, 1998; WHO, 1984).

O controle do caramujo realizado com moluscicidas é considerado ideal quando o composto em baixa concentração elimina todas as fases do ciclo de vida do caramujo, desde o embrião até o adulto, nas condições ambientais em que o animal vive, apresenta baixo custo, é estável no armazenamento em condições tropicais, fácil de transportar e aplicar, não apresenta risco no transporte, manuseio e aplicação, tem ação letal seletiva a moluscos, é inócuo para o homem, animais domésticos, peixes e plantas, não sofre decomposição na água e no solo e é estável em condições de temperatura e irradiação solar (PAULINI, 1965; WHO, 1961, 1965, 1985).

Os primeiros moluscicidas químicos utilizados (1913-1915) foram os derivados do cálcio e do cobre (MCCULLOUGH; MOTT, 1983; WEBBE, 1987). Posteriormente, diversos produtos químicos (cerca de 20.000) foram avaliados quanto à atividade moluscicida; destes, o pentaclorofenol e seus sais pentaclorofenato de sódio e pentaclorofenato de cobre foram identificados como produtos altamente letais para caramujos, pois agiam interferindo em processos enzimáticos vitais. No entanto, a toxicidade a diversos organismos impediu a utilização desses produtos em grande escala (WHO, 1961, 1973).

Atualmente, a niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida) comercializada como Bayluscide (Bayer, Leverkusen, Bayerwerk, Alemanha) (Figura 7) é o único moluscicida recomendado pela OMS para uso em larga escala nos programas de controle da esquistossomose (WHO, 1993). Contudo, esse composto é tóxico para diversas outras espécies de caramujos, peixes e outros organismos aquáticos, seu uso prolongado causa danos em plantas aquáticas e terrestres, possui alto custo, se decompõe rapidamente sob ação da luz solar e sua aplicação não previne a recolonização por caramujos sobreviventes, sendo necessárias frequentes reaplicações, o que pode favorecer a seleção de populações resistentes (ABREU; GOULART; BRETT, 2002; GIOVANELLI et al., 2002; POINTIER; GIBODA, 1999; WHO, 1992).

Figura 7 - Descrição química e molecular da niclosamida.



Peso molecular: 327,12

Nome químico: 2,5- dicloro- 4'-nitro-salicilanilida

Fórmula química: $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$

Registro CAS n.º 50-65-7

Fonte: Rapado (2012).

1.6.1 Moluscidas de origem vegetal

A inexistência de um método efetivo para o controle da doença, o alto custo dos métodos, a ineficiência dos moluscidas sintéticos disponíveis até o momento e a busca de soluções alternativas não poluidoras visando à preservação ambiental têm incentivado a pesquisa de moluscidas de origem vegetal (BEZERRA et al., 2002; KOOLS; MCCULLOUGH, 1982; LUNA et al., 2005; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; RAPADO et al., 2010; SCHALL et al., 1998, 2001; SINGH; YADAV; SINGH, 2009; WHO, 1965, 1992).

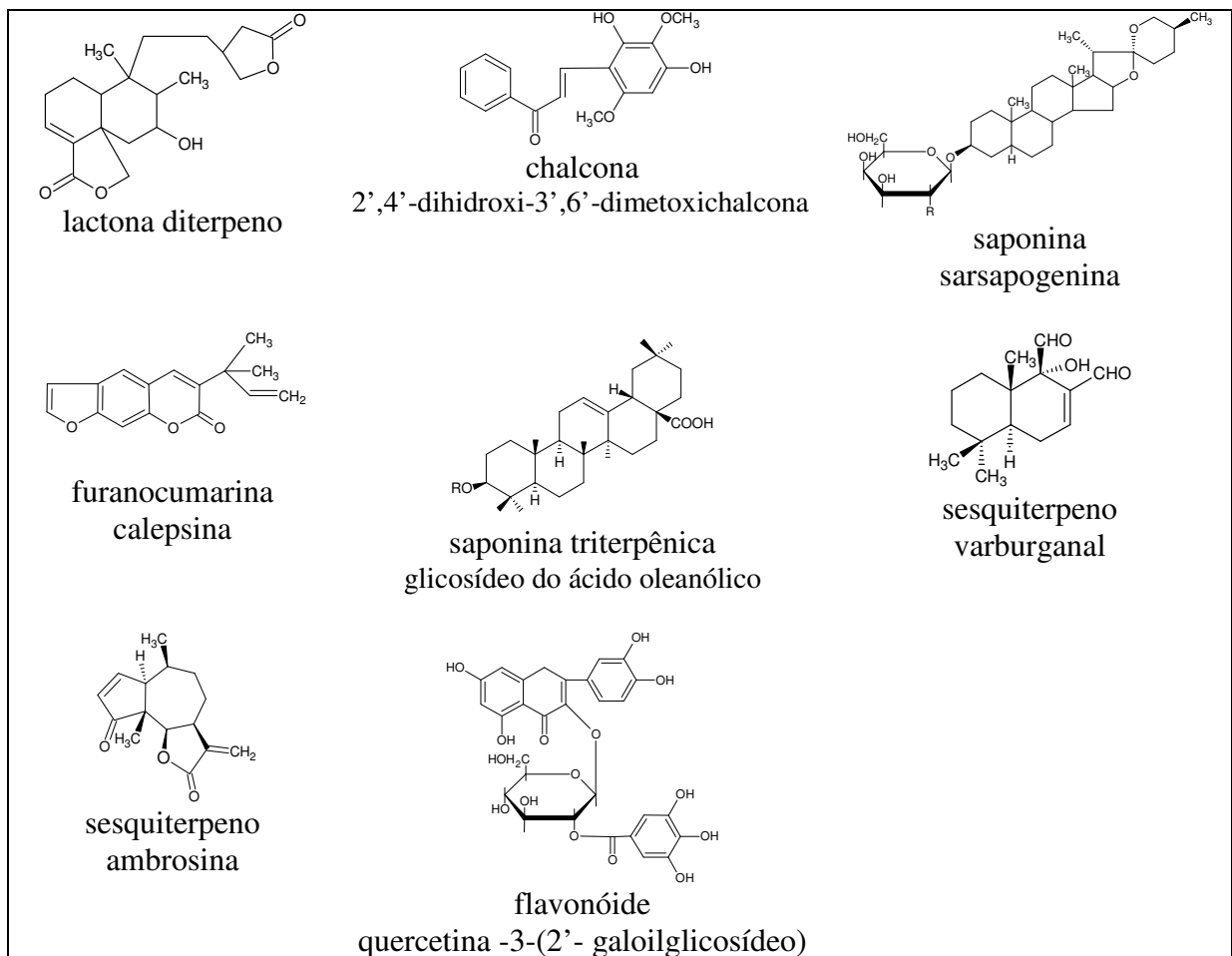
Os estudos com espécies vegetais têm sido realizados de acordo com as especificações da OMS para moluscidas químicos (WHO, 1961, 1965, 1985), que define um moluscida como viável quando apresentar efeito tóxico em caramujos adultos em concentração menor ou igual a 20 ppm do composto isolado e menor ou igual a 100 ppm do extrato bruto. As plantas em estudo devem ser abundantes em áreas endêmicas da doença, ou serem facilmente cultiváveis, o produto ativo responsável pela toxidez deve estar presente em partes de fácil regeneração da planta, como folhas, flores, frutos e sementes. O princípio ativo deve ser extraído preferencialmente com água e manter-se ativo sob alterações físicas e químicas como pH, luz solar e alterações de temperatura (KLOOS; MCCULLOUGH, 1982; WHO, 1983).

A ação moluscida de plantas tem sido estudada desde 1930 e a descoberta de vegetais com potencial moluscida permitiu o uso de algumas espécies em programas de controle. Archibald (1933) usou os frutos das espécies *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile e *Balanites maughamii* Sprage (Balanitaceae) em extrato aquoso, cuja composição contém uma isobutilamida e a saponina espirostano, para matar caramujos dos gêneros *Bullinus* e *Biomphalaria*, miracídeos e cercárias de *S. mansoni* no Sudão (KLOOS; MCCULLOUGH, 1982). Archibald (1933) e Anantaraman (1955) recomendaram que *B. aegyptica* fosse plantada ao redor de áreas endêmicas da esquistossomose, pois os frutos dessa árvore ao cair

na água suprimiam a população de caramujos transmissores sem alterar a potabilidade da água. Mais tarde, as espécies *Ambrosia maritima* L. (Asteraceae) e *Sapindus saponaria* (L.) Nash (Sapindaceae) foram empregadas em campo com a mesma finalidade (JURBERG et al., 1989; KLOOS; MCCULLOUGH, 1987).

Henderson, Farnsworth e Myers (1987) em estudos iniciais de isolamento e identificação de compostos vegetais com atividade moluscicida, obtiveram substâncias ativas em concentrações inferiores ou igual a 1 ppm. Os primeiros compostos identificados pertencem à classe das saponinas, como os triterpenóides (glicosídeo do ácido oleanólico) e espirostano; posteriormente foram as cumarinas e furanocumarinas (calepsina), flavonóides (quercetina e chalcona), sesquiterpenos (ambrosina e varburganal), alcalóides quinolizidínico, lactonas diterpênicas e taninos (Figura 8). Destes, os compostos pertencentes à classe das saponinas e dos taninos foram os mais promissores.

Figura 8 – Estrutura química dos primeiros compostos com atividade moluscicida descrita

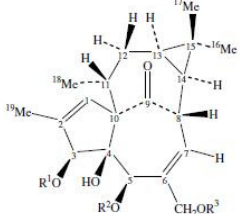
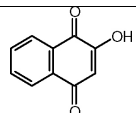
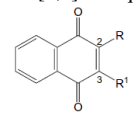
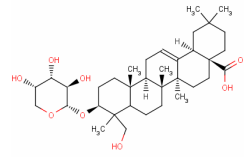


Fonte: Rapado (2012).

As saponinas, abundantes em diversas famílias vegetais, apresentam toxicidade e ação hemolítica em *B. glabrata* (CL₉₀ 1,5 ppm) e solubilidade em água. No entanto, em baixas concentrações são tóxicas para peixes e alguns vertebrados aquáticos, devido à interferência em processos respiratórios causando paralisia do funcionamento das brânquias. Os taninos apresentam baixa toxicidade para organismos aquáticos, estão presentes em diversas famílias vegetais e sua extração é facilmente realizada com água, mas quando comparado as saponinas apresentam reduzido efeito moluscicida (CL₉₀ 50 ppm em *B. glabrata*) (COSTA; MORS, 1981; HOSTETTMAN; MARSTON, 1987).

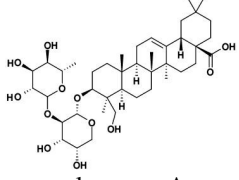
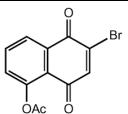
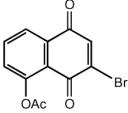
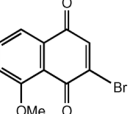
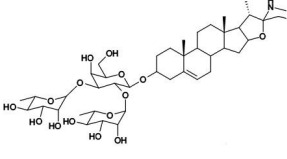
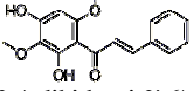
Quadro 1 – Atividade moluscicida de alguns compostos de origem vegetal em caramujos *Biomphalaria* e toxicidade descritos.

(continua)

Origem	Composto	Grupo químico	Atividade moluscicida	Toxicidade	Referência
<i>Euphorbia cornigera</i> Boiss (Euphorbiaceae)	 <p>10 compostos N-(2-aminobenzoil) éster antranílico</p>	éster diterpeno	CL ₅₀ 11,4 a 75,4 µg/mL <i>Biomphalaria glabrata</i>	não avaliada	Baloch, Baloch e Baloch (2009)
	 <p>lausona (2-hidroxi-[1,4]naftoquinona)</p>  <p>9 compostos derivados de [1,4] naftoquinona</p>	quinona	CL ₉₀ 4,2 a 92,7 µg/mL <i>B. glabrata</i>	tóxicos em <i>Artemia salina</i>	Camara et al. (2008)
Familia Asteraceae	9 lactonas sesquiterpênicas	lactona sesquiterpeno	CL ₅₀ 27,9 a 88,5 µg/mL <i>Biomphalaria peregrina</i>	não avaliada	Borkosky et al. (2009)
<i>Cephalaria ambrosioides</i> Sibth. & Sm.	 <p>leontoside A</p>	saponina	CL ₁₀₀ 5,4 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	não avaliada	Pasi et al. (2009)

Quadro 1 – Atividade moluscicida de alguns compostos de origem vegetal em caramujos *Biomphalaria* e toxicidade descritos.

(conclusão)

Origem	Composto	Grupo químico	Atividade moluscicida	Toxicidade	Referência
<i>Cephalaria ambrosioides</i> Sibth. & Sm.	 calopanax A	saponina	CL ₁₀₀ 6,2 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	não avaliada	Pasi et al. (2009)
	 2-bromo-5-acetóxi-1,4-naftoquinona	naftoquinona	CL ₉₀ 2,2 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	não avaliada	Ribeiro et al. (2009)
	 3-bromo-5- acetóxi-1,4-naftoquinona		CL ₉₀ 1,6 µg/mL em <i>B. glabrata</i>		
	 3-bromo-5-metoxi-1,4-naftoquinona		CL ₉₀ 1,4 µg/mL em <i>B. glabrata</i>		
<i>Cratylia floribunda</i> Benth.	lectinas Dglicose/manose ligantes	proteínas	CL ₉₀ 50,3 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	tóxico em <i>Artemia salina</i>	Santos et al. (2010)
<i>Dioclea guianensis</i> Benth.	lectinas glicose/manose ligantes	proteínas	CL ₉₀ 41,0 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	toxico em <i>Artemia salina</i>	Santos et al. (2010)
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam	 solamargina	alcaloide	CL ₁₀₀ 148,0 µg /mL em <i>Biomphalaria pfeifferi</i>	tóxico em peixes, insetos e larvas	Bagalwa et al. (2010)
<i>Polygonum senegalense</i> Meisn	 2,4-dihidroxi 3',6'-dimetoxichalcona	chalcona	CL ₁₀₀ 10,0 µg/mL em <i>B. glabrata</i>	não avaliada	Adewunmi, Ogungbamila e Oluwadiya (1987)

Fonte: Rapado (2012).

Pesquisas vêm sendo realizadas visando a descoberta de compostos de origem vegetal com ação moluscicida e de impacto ambiental menor que o causado pela niclosamida, segue no Quadro 1 a descrição de alguns desses compostos. No entanto, até o momento não há um produto eficaz, seja pela não obtenção de um composto isolado que atue apenas sobre o

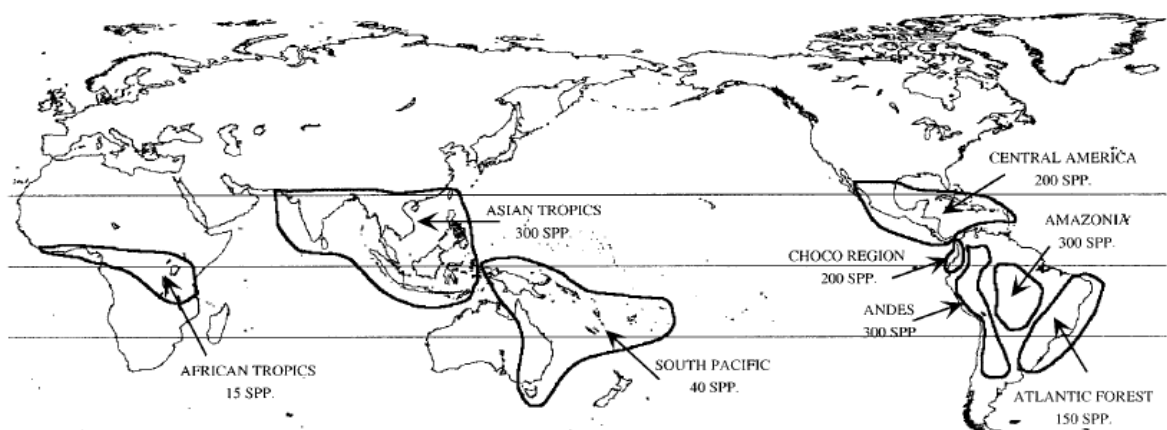
caramujo alvo, ou pela dificuldade em obter quantidades suficientes do composto para o uso em larga escala.

Dos compostos citados, os pertencentes à família Euphorbiaceae são os mais promissores. O látex produzido pelas espécies dessa família possui em sua constituição terpenos e apresentam atividade moluscicida (100% letalidade sobre *B. glabrata* a 1,5 ppm) e esquistosomicida (BAPTISTA et al., 1994; DE-CARVALHO et al., 1998; SCHALL et al., 1998). Em área endêmica, o uso do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* na concentração de 5 ppm, quando aplicado duas vezes, em intervalo de duas semanas mostrou ser mais eficaz e viável que a niclosamida (SCHALL et al., 2001). Todavia, o látex das espécies de *Euphorbia*, em geral, é tóxico para organismos aquáticos e não causam a morte de embriões de *B. glabrata*, dificultando a eliminação dos caramujos (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; SANTOS et al., 2007).

1.7 Família Piperaceae

A família Piperaceae é típica de regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios, possuem cerca de 14 gêneros e 1950 espécies, sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais abundantes com 700 e 600 espécies respectivamente (Figura 9). As espécies dessa família podem apresentar hábito arbustivo, arbóreo ou herbáceo e crescem geralmente no interior ou na margem de formação florestais (BARROSO, 1991; JARAMILLO; MANOS, 2001; MABBERLEY, 1997).

Figura 9 - Distribuição geográfica do gênero *Piper*.



Fonte: Jaramillo e Manos (2001).

A família Piperaceae possui espécies com atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata*. Rapado et al. (2010) realizaram estudo com extratos alcoólicos de 13 espécies de *Piper*, das quais 5 apresentaram atividade moluscicida em concentrações recomendadas pela OMS (Quadro 5). Orjala et al. (1993a) descreveu o cromeno metil-8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato, isolado de *Piper aduncum* como também ativo em *B. glabrata*. Assim, esta família possui espécies promissoras para estudos de isolamento e identificação de possíveis compostos moluscicidas.

1.7.1 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* reúne um grande número de espécies de uso na medicina tradicional e com potencial econômico e comercial. A espécie mais conhecida comercialmente é a *Piper nigrum*, denominada pimenta do reino, seus frutos são utilizados na culinária como especiaria por serem pungentes, devido à presença de derivados de piperina (SIDDIQUI et al., 1997).

Espécies de *Piper* são usadas na medicina tradicional na Ásia, ilhas do Pacífico, América Latina e principalmente na China; são aplicadas no tratamento de asma, bronquite, febre, reumatismo, no tratamento de doenças venéreas, desordens intestinais, males genito-urinários, epilepsia, como contraceptivo, antiinflamatório e inseticida (ALBIERO et al., 2005; FACUNDO, 2006; OLIVEIRA; MAUSE; NUNOMURA et al., 2005).

Neste trabalho duas espécies do gênero *Piper* foram estudadas – *Piper diospyrifolium* e *Piper tuberculatum*.

1.7.1.1 *Piper tuberculatum*

Em algumas regiões do nordeste brasileiro, a espécie *Piper tuberculatum* Jacq (Figura 10) é popularmente conhecida como pimenta longa e pimenta d'arda e tem sido usada na medicina popular como sedativo e antídoto contra mordidas de cobra e seus frutos usados como condimento alimentar (FELIPE et al., 2007).

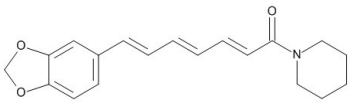
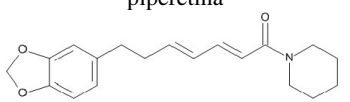
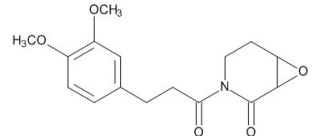
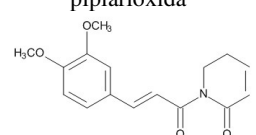
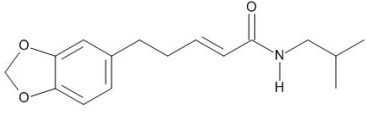

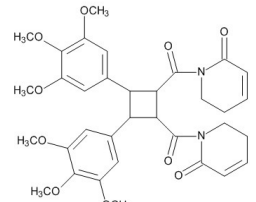
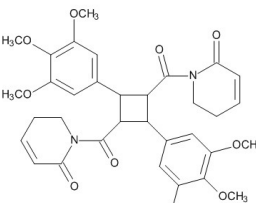
Figura 10 - *Piper tuberculatum* Jacq (foto da planta coletada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo).



Fonte: Kato (2012).

O estudo fitoquímico de *P. tuberculatum* demonstrou a presença de amidas como piperina, piperidina, pelitorina e piperlonguminina todas com atividade fungicida e inseticida (CHAVES; SANTOS, 2003; LAGO et al., 2004; NAVICKIENE et al., 2000; da SILVA et al., 2002). O quadro 2 ilustra alguns constituintes químicos isolados de *P. tuberculatum* e suas atividades biológicas.

Quadro 2 - Composição química e atividades biológicas de *Piper tuberculatum*.

Parte da planta	Atividade biológica	Composto	Referência
Caule	na	 <p>piperetina</p>  <p>piperdardina</p>	Araújo-Júnior et al. (1997)
Folhas	Inseticida (repelente de formigas <i>Atta cephalotes</i>)	 <p>piplarioxida</p>  <p>demetoxipiplartina</p>	Capron e Wiemer (1996)
Folhas e sementes	<p>Inibição do crescimento da broca de milho (<i>Ostrinia nubilalis</i>)</p> <p>Inseticida (larvas de mosquitos <i>Aedes atropalpus</i>)</p> <p>Inseticida (broca da cana de açúcar <i>Diatraea saccharalis</i> e lagarta da soja <i>Anticarsia gemmatilis</i>)</p> <p>Fungicida (<i>Cladosporium sphaerospermum</i> e <i>Cladosporium cladosporioides</i>)</p> <p>Inseticida (<i>Alabama argilaceae</i> curuquerê do algodoeiro)</p>	 <p>4,5-diidropiperlonguminina</p>  <p>pelitorina</p>	Bernard et al. (1995); Miranda et al. (2002); Navickiene et al. (2000); Da Silva et al. (2002)
Raízes	na	 <p>tetraidropiplartina-dimeroA</p>  <p>piplertina-dimeroA</p>	Braz-Filho et al. (1981)

na – não avaliada.

O composto piplartina encontra-se descrito na sessão amida (Quadro 4)

Fonte: Rapado (2012).

1.7.1.2 *Piper diospyrifolium*

A espécie *Piper diospyrifolium* Kunth possui características arbóreas (Figura 11) e encontra-se distribuída na Mata Atlântica. Não há relatos na literatura sobre sua composição química, contudo, estudo recente com o óleo essencial das folhas dessa espécie indicou a presença majoritária de sesquiterpeno (68,21%) e hidrocarbonetos monoterpenos (19,41%), compostos com atividade fungicida em cepas patogênicas de *Candida* (VIEIRA et al., 2011). As folhas dessa espécie em extrato alcoólico também possuem atividade moluscicida significativa em *B. glabrata* (CL₉₀ 23,30 ppm), contudo não é sabido a qual composto ou grupo de compostos é atribuída essa atividade (RAPADO et al., 2010).

Figura 11 – *Piper diospyrifolium* Kunth (foto da planta coletada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo).



Fonte: Kato (2012).

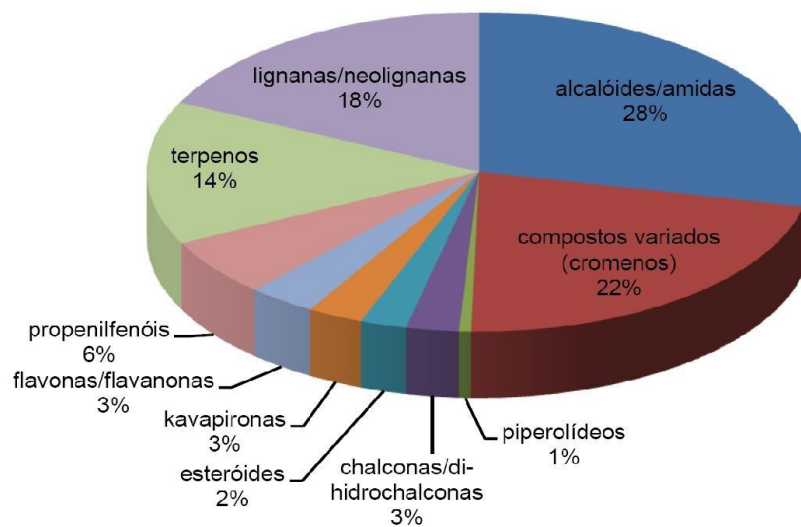
1.7.2 Fitoquímica e potencial biológico de *Piper*

Apesar de numerosa, esta família possui poucas espécies com fitoquímica descrita; o gênero *Piper*, mais representativo em número de espécies, possui cerca 112 espécies com fitoquímica elucidada e revelam a presença de aproximadamente 667 metabólitos secundários distintos. A Figura 12 apresenta a distribuição desses compostos em classes (DYER; PALMER, 2004).

Como observado na Figura 12, a composição química de *Piper* é diversificada com compostos isolados pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários (BALDOQUI et al., 1999; DYER; PALMER, 2007; KATO; FURLAN, 2007; PARMAR, 1998). Os alcalóides e amidas são os mais representativos seguidos de lignanas e neolignanas,

terpenos, propenilfenóis, flavonas, pironas, chalconas, cromenos e ácidos benzóicos (BALDOQUI et al., 1999; BENEVIDES et al., 1999; LAGO et al., 2004; MARQUES et al., 2007; NAVICKIENE et al., 2000; PARMAR, 1998; RAMOS et al., 1986). Devido a essa diversidade, os metabólitos oriundos dessa família têm apresentado atividade biológica em organismos diversos (Quadro 3).

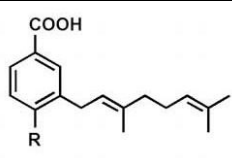
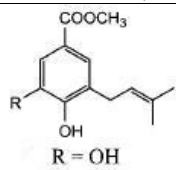
Figura 12 - Porcentagem de ocorrência dos metabólitos secundários identificados em estudo fitoquímico realizados com espécies do gênero *Piper*.



Fonte: Reigada (2009).

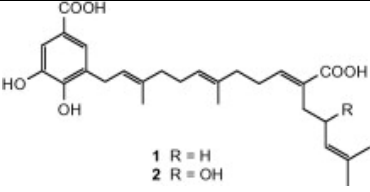
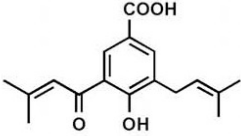
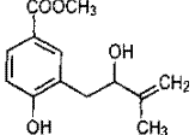
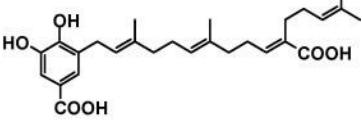
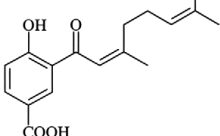
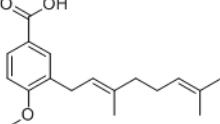
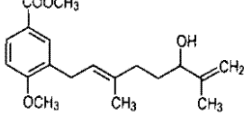
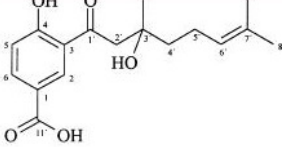
Quadro 3 - Alguns compostos isolados de *Piper* e suas atividades biológicas/farmacológicas.

(continua)

Grupos químicos	Atividade biológica	Referências
Ácidos benzóicos		
 <p>R = OCH₃</p> <p>3-(3,7-dimetil-2,6-octadieno)-4-metoxibenzoico</p>	Leishmanicida	Flores et al. (2009)
 <p>R = OH</p> <p>metil 3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil)benzoato</p>	Leishmanicida Tripanocida	Flores et al. (2008)

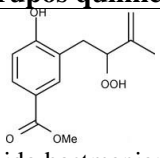
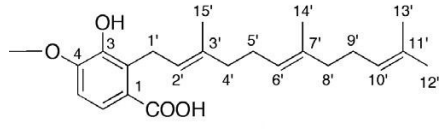
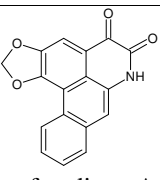
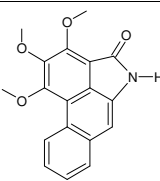
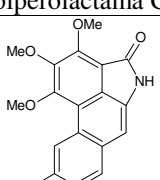
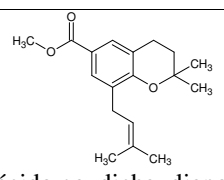
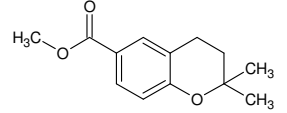
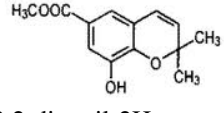
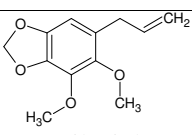
Quadro 3 - Alguns compostos isolados de *Piper* e suas atividades biológicas/farmacológicas.

(continuação)

Grupos químicos	Atividade biológica	Referências
 <p>1 R = H 2 R = OH</p> <p>3-[(2E,6E,10E)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico</p>	Antiplasmoidal	Flores et al. (2009)
 <p>4-hidroxi-3-(3-metil-1-oxo-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)benzoic</p>	Tripanocida	Flores et al. (2009)
 <p>metil4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)benzoato</p>	Tripanocida	Flores et al. (2008)
 <p>ácido caldensínico</p>	Fungicida Moluscicida	Freitas et al. (2009) Takahashi (2011)
 <p>ácido4-hidroxi benzóico prenilado</p>	Antioxidante	Yamaguchi et al. (2006)
 <p>3-(3,7-dimetil-2,6-octadieno)-4-metoxibenzoico</p>	Fungicida	Baldoqui et al. (1999)
 <p>metil3-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadieno)-4-metoxi-benzoato</p>	Bactericida	Orjala et al. (1993b)
 <p>ácido crassinérvico</p>	Fungicida	Lago et al. (2004)

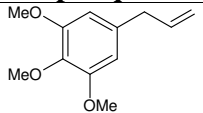
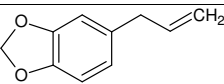
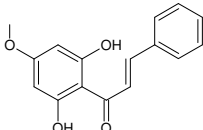
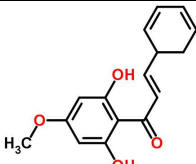
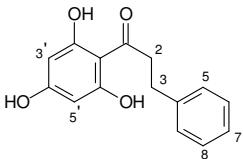
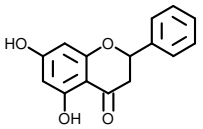
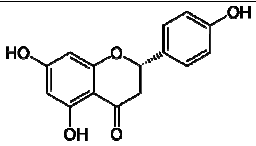
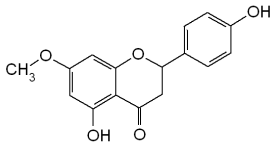
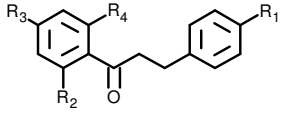
Quadro 3 - Alguns compostos isolados de *Piper* e suas atividades biológicas/farmacológicas.

(continuação)

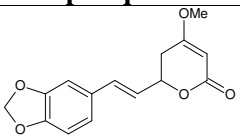
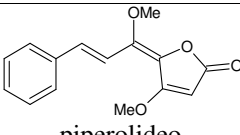
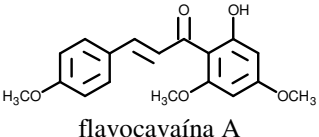
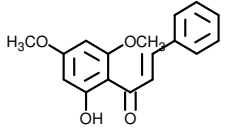
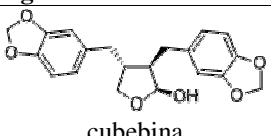
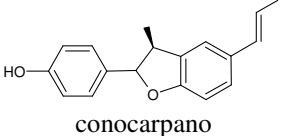
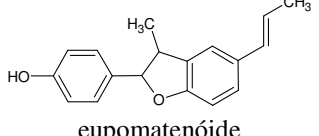
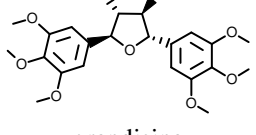
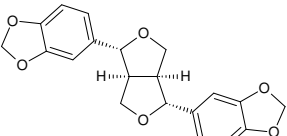
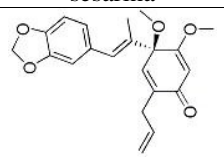
Grupos químicos	Atividade biológica	Referências
 <p>ácido hostmaniano</p>	Fungicida	Lago et al. (2004)
 <p>2-farnesil-3-hidroxi-4-metoxibenzoico</p>	Pungência	Correa, Sterner e Echeverri (2011)
Alcalóides		
 <p>cefaradiona A</p>	Citotóxica	Gupta et al. (1999)
 <p>piperolactama C</p>	Citotóxica	Tabopda et al. (2008)
 <p>stigmactama</p>	Citotóxica	Xiao et al. (2005)
Cromenos		
 <p>ácido gaudichaudiano</p>	Tripanocida Fungicida	Batista et al. (2008) Morandim et al. (2005)
 <p>2,2-dimetilcromeno-6-carboxilato de metila</p>	Fungicida	Lago et al. (2007)
 <p>metil-8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato</p>	Moluscicida	Orjala et al. (1993a)
Fenilpropanóides		
 <p>Dilapiol</p>	Inseticida Antimicrobiana	Orjala et al. (1993a) Benevides et al. (1999)

Quadro 3 - Alguns compostos isolados de *Piper* e suas atividades biológicas/farmacológicas.

(continuação)

Grupos químicos	Atividade biológica	Referências
 Elemicina	Antimicrobiana	Konishi et al. (2005)
 Safrol	Antimicrobiana Antioxidante	Oyedeji et al. (2005) Guerrini et al. (2009)
Flavonas e Chalconas		
 2,6-dihidroxi-4-metoxichalcona	Leishmanicida	Torres-santos et al. (1999)
 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	Fungicida	Baldoqui et al. (1999)
 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona	Antitumoral	Szliszka et al. (2010)
 Pinostrobin	Inseticida Antimicrobiana (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	Xuan et al. (2006) Ruddock et al. (2011)
 naringenina	Fungicida	Danelutte et al. (2003)
 sacuranetina	Fungicida	Danelutte et al. (2003)
 dihidrochalcona R1 OAc - R2OAc - R3 OCH ₃ - R4 OAc	Leishmanicida	Hermoso et al. (2003)

Quadro 3 - Alguns compostos isolados de *Piper* e suas atividades biológicas/farmacológicas.
(conclusão)

Grupos químicos	Atividade biológica	Referências
 metisticina	Apoptose (hepatócitos)	Tang et al. (2011)
 piperolideo	Bactericida	Mata et al. (2004)
 flavocavaina A	Apoptose e antitumoral	Zi e Simoneau (2005)
 flavocavaina B	Leishmanicida Hepatotoxicidade Apoptose	Flores et al. (2007) Zhou et al. (2010) Sakai et al. (2011)
Lignanas e Neolignanas		
 cubebina	Tripanocida Leishmanicida	Andrade et al. (2011) Bodiwala et al. (2007)
 conocarpano	Antinociceptivo Bactericida / Fungicida Tripanocida	da Silva et al. (2010) Campos et al. (2007) Luize et al. (2006)
 eupomatenóide	Bactericida / Fungicida Tripanocida	Campos et al. (2007) Luize et al. (2006)
 grandisina	Tripanocida	Martins et al. (2003)
 sesarina	Leishmanicida	Bodiwala et al. (2007)
 futoquinol	Anti inflamatória	Lin et al. (2006)

O grupo amida encontra-se descrito na Quadro 4.
Fonte: Rapado (2012).

1.7.2.1 Amidas

As amidas compõem o grupo mais representativo entre os compostos isolados de espécies do gênero *Piper*. A piperina (Quadro 4), amida isolada de *Piper nigrum*, conhecida como pimenta do reino é o composto responsável pelo sabor pungente de muitas espécies desse gênero usadas como condimento (PARMAR et al., 1997); já o aroma característico desse grupo é atribuído à pelitorina (FELIPE et al., 2007).

Além do uso como condimento, as amidas destacam-se por possuírem diversas atividades biológicas descritas, constituindo um grupo alvo para pesquisas que relacionam química de produtos naturais e atividades biológicas. Pesquisadores do laboratório de Química de Produtos Naturais da USP vem realizando estudos fitoquímicos em Piperaceae e identificaram espécies com diversas amidas em sua composição, em especial *P. tuberculatum* que possui em suas raízes majoritariamente a piplartina (NAVICKIENE et al., 2000; Da SILVA et al., 2002). Atualmente essa amida tem sido estudada por apresentar múltiplas atividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* (Quadro 4).

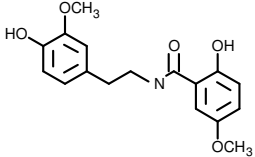
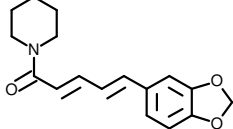
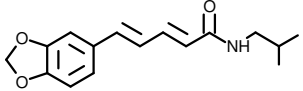
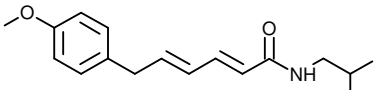
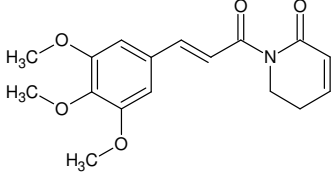
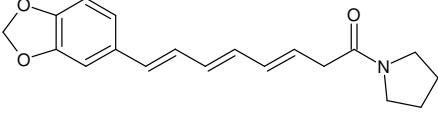
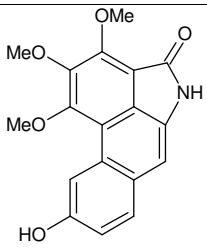
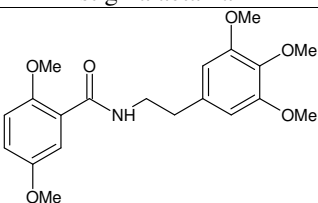
1.7.2.2 Ácidos benzóicos e derivados

Os ácidos benzóicos e seus derivados estão presentes em espécies de *Piper* como *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper hostmannianum* e *Piper gaudichaudianum* e muitos deles apresentam atividades biológicas como fungicida, bactericida, antioxidante e antiparasitária (em *Leishmania brazilliensis*, *Trypanonoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*) descritas (BALDOQUI et al., 1999; FLORES et al., 2009; ORJALA et al., 1993a; YAMAGUCHI et al., 2006) (Quadro 3).

1.7.2.3 Chalconas e flavanonas

As chalconas são precursoras da via de biossíntese dos flavonóides e possuem uma variedade de atividades biológicas, sendo as mais comuns a edulcorante ou protetora contra o calor e luz (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). As chalconas presentes em *Piper*, como em inflorescências de *P. aduncum*, possuem atividade antiparasitária em *Leishmania amazonensis* e as flavanonas das folhas de *P. crassinervium* atividade fungicida em fungos do gênero *Cladosporium* (DANELUTTE et al., 2003; TORRES-SANTOS et al., 1999).

Quadro 4 – Amidas isoladas de espécies de *Piper* e suas atividades biológicas e farmacológicas.

Composto	Atividade biológica/farmacológica	Referência
 <p>aduncamida</p>	Bactericida	Orjala et al. (1993c)
 <p>piperina</p>	Imunomodulatória Antitumoral Inseticida Tripanocida Estimulo neural	Sukunila e Kuttan (2004) Bezerra et al. (2006) De Paula et al. (2000) Ribeiro et al. (2004) Wattanathorn et al. (2008)
 <p>piperlonguminina</p>	Antitumoral Inseticida Fungicida Leishmanicida	Bezerra et al. (2008) Navickiene et al. (2000) Marques et al. (2007) Bodiwala et al. (2007)
 <p>piperovatina</p>	Piscicida Anti-inflamatória Anestésica Bactericida Fungicida	Mcferrén eRodríguez (1998) Rodrigues et al. (2011) Mcferrén et al. (2002) Silva et al. (2009) Marques et al. (2007)
 <p>pipartina</p>	Ansiolítico Antinociceptivo Antitumoral Antiproliferativa Antiagregante plaquetário Fungicida Inseticida Tripanocida Leishmanicida Esquistossomicida	Felipe et al. (2007) Rodrigues et al. (2009) Bezerra et al. (2008) Bezerra, et al. (2007) Fontenele et al. (2009) Da Silva et al. (2002) Navickiene et al. (2003) Contiguiba et al. (2009) Bodiwala et al. (2007) Moraes et al. (2011)
 <p>sarmentosina</p>	Antituberculose Antimalárico	Rukachaisirikul et al. (2004) Kiuchi et al. (1988)
 <p>stigmactama</p>	Citotóxica	Xiao et al. (2005)
 <p>taiwanamida C</p>	Antiagregante plaquetário	Chen et al. (2004)

Fonte: Rapado (2012).

As flavocavaínas (A, B e C), chalconas inicialmente descritas em *Piper methysticum*, conhecida como Kava-kava são compostos considerados hepatotóxicos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). Apesar de considerada hepatotóxica, até o momento nenhuma flavocavaína foi tóxica isoladamente; a toxicidade foi descrita com relação a extratos brutos de espécies que possuíam como constituintes majoritários as flavocavaínas. Recentemente, Teschke, Qiu e Lebot (2011) relataram que a hepatotoxicidade descrita com relação a *P. methysticum* pode não ser atribuída as flavocavaínas, mas sim, com a presença de fungos e bactérias, que comumente se associam a essas espécies e produzem toxinas, como a aflatoxina, potencialmente tóxica; essa hipótese tem sido corroborada por outros estudos (BAKER, 2011; TESCHKE; SARRIS; SCHWEITZER, 2011).

1.8 Obtenção de compostos com atividade moluscicida em espécies de *Piper*

A partir do conhecimento da atividade moluscicida de uma espécie vegetal, diferentes metodologias podem ser desenvolvidas para a obtenção de compostos ativos. A escolha das metodologias depende das informações disponíveis sobre o vegetal em estudo. De modo geral, a busca de compostos ativos é realizada pela avaliação da atividade de compostos já isolados; e em extratos brutos por meio de fracionamento cromatográfico associado aos monitoramentos da atividade moluscicida das frações obtidas e do perfil químico das frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN). A combinação do monitoramento biológico e dos dados espectrais das frações possibilita direcionar as operações de fracionamento e favorece o isolamento dos compostos ativos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007; HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

O fracionamento cromatográfico biomonitorado em *B. glabrata* é realizado, geralmente, em espécies cujos extratos brutos ativos não possuem composição química descrita. Essa metodologia possibilita a descoberta de novos compostos, o isolamento e a identificação de compostos ativos e favorece um conhecimento inicial da composição química do vegetal.

Quando a espécie cujo extrato bruto ativo em *B. glabrata* possui composição química elucidada e compostos isolados com atividades biológicas descritas, a busca de compostos moluscicida inicia-se geralmente pela avaliação desses compostos bioativos. Essa avaliação inicial pode auxiliar na seleção dos compostos a serem estudados e na identificação dos grupos químicos com atividade moluscicida.

Outra forma de direcionar a busca de compostos em espécies com composição química descrita é realizada por meio de análises quimiométricas, que podem relacionar dados químicos e de atividade biológica de uma espécie e verificar uma possível relação entre eles. A Análise de Componente Principal (PCA) tem sido uma ferramenta quimiométrica amplamente empregada em estudos de metabolômica e de perfil metabólico de espécies vegetais (BAILEY et al., 2003; DEFERNEZ; COLQUHOUN, 2003; PARVEEN et al., 2007; PAVÓN et al., 2006).

O método de PCA consiste na organização de grandes quantidades de dados a partir de transformação ortogonal linear, que converte esses dados em uma matriz de tal forma que a maior variância de qualquer projeção de dados seja colocada sobre a primeira coordenada (chamada primeira componente principal), a segunda maior variação, na segunda coordenada, e assim por diante (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

A Análise de Componente Principal (PCA) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) são métodos de regressão multivariados indicados para estudos onde o número de variáveis é maior que o número de amostras sendo possível controlar as variáveis colineares. A regressão PLS, assim como PCA, identifica as variáveis sintéticas (Variáveis Latente - VL) que descrevem a variação em um conjunto de amostras, de acordo com informações adicionais, sendo assim um método de estudo supervisionado (GELADI, 1986).

O Laboratório de Química Fundamental da USP e o Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan vêm realizando, desde 1996, estudos fitoquímicos e bioensaios com diversas espécies de Piperaceae, a fim de obter compostos moluscicidas viáveis e promissores. Nesse contexto, Rapado et al. (2010), em estudo de bioprospecção avaliaram extratos brutos metanólicos de 13 espécies de Piperaceae; destes, 5 apresentaram atividade moluscicida em concentrações recomendadas pela OMS (Quadro 5). *P. cuyabanum* e *P. diospyrifolium* são espécies que não possuem composição química descrita, já *P. aduncum*, *P. crassinervium* e *P. hostmannianum* apresentam composição química descrita bem como compostos isolados e bioativos (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2005; DANELUTTE et al., 2003, 2005; DÉVÉHAT et al., 2002; LAGO et al., 2004; OLIVEIRA; MAUSE; NUNOMURA, 2005; YAMAGUCHI et al., 2006). Esse trabalho serviu de base para a busca de compostos com atividade moluscicida em Piperaceae e considera as espécies de *Piper* promissoras para a obtenção de compostos ativos.

Quadro 5 - Espécies de *Piper* com atividade moluscicida e seus valores de concentração letal (CL₉₀) em *B. glabrata*, segundo Rapado et al. (2010).

Espécie vegetal	Origem do extrato metanólico	Concentração letal CL ₉₀ (ppm)
<i>Piper aduncum</i> L.	folha	6,46 [5,34 - 9,51]
<i>Piper crassinervium</i> Kunth	folha	38,15 [33,98 - 46,04]
<i>Piper cuyabanum</i> C.DC.	folha	12,92 [11,25 - 16,98]
<i>Piper diospyrifolium</i> Kunth	folha	23,30 [19,80 - 26,81]
<i>Piper hostmannianum</i> R.S.	folha	34,29 [32,13 - 36,44]

[] intervalo de confiança de 95%
 Fonte: Rapado et al. (2010).

1.9 Estudo da toxicidade dos compostos ativos

Após a obtenção de um composto com ação moluscicida, a OMS recomenda que sejam realizados ensaios de toxicidade em vertebrados e invertebrados para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos em humanos, animais e plantas (WHO, 1983).

Os ensaios de ecotoxicológicos estimam o impacto que um composto químico pode causar no ambiente. Segundo Farré e Barceló (2003) a utilização de diferentes organismos de níveis tróficos distintos é essencial para prever os possíveis danos ambientais que o composto em estudo pode acarretar.

Alguns organismos como microcrustáceos (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*), algas (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*) e peixes (*Danio rerio* e *Pimephales promelas*) são considerados organismos padrões para ensaios ecotoxicológicos por serem utilizados em metodologias validadas e rotineiramente utilizados nos ensaios de toxicidade (ABNT, 2004a; ABNT, 2004b; ABNT, 2005; BIRGE et al., 1985; MOUNT ; NORBERG, 1984; WEBER, 1989).

O peixe é o vertebrado mais recomendado para ensaios ecotoxicológicos, pois apresenta sensibilidade e permite análise em tempo real (durante o ensaio) de possíveis alterações fisiológicas e comportamentais. Os ensaios ecotoxicológicos avaliam a mortalidade dos peixes expostos a um composto químico por no máximo 96 horas e os resultados determinam a concentração do composto necessária para causar a morte de 50% dos organismos em um determinado tempo (CL₅₀) (FARRÉ; BARCELO, 2003).

Danio rerio, conhecido como paulistinha é uma espécie tropical, ovípara, onívora, que atua como consumidor secundário na cadeia alimentar aquática (Figura 13D); esse organismo

tem sido o peixe mais utilizado em ensaios de toxicidade (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; OLIVEIRA-FILHO; LOPES; PAUMGARTTEN, 2004; TRAMUJAS et al., 2006).

Entre os invertebrados, microcrustáceos do gênero *Daphnia* são os organismos mais utilizados nos estudos ecotoxicológicos. Esses microcrustáceos possuem alta sensibilidade e ciclo reprodutivo curto, fatores que favorecem o uso em ensaios ecotoxicológicos, onde os parâmetros imobilidade e reprodução são avaliados.

A espécie *Daphnia similis* tem sido utilizada principalmente no Brasil, conhecida como pulga d'água é um microcrustáceo planctônico, com comprimento máximo de 3,5 mm, atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão (Figura 13C) (FERRAZ et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; OLIVEIRA-FILHO; LOPES; PAUMGARTTEN, 2004).

Neste trabalho, a obtenção de compostos moluscidas foi realizada a partir do fracionamento biomonitorado de uma espécie de *Piper* e pela avaliação da atividade moluscida de amidas e chalconas de *Piper*. Os resultados estão divididos em duas partes, sendo a primeira a descrição e resultados relacionados ao fracionamento biomonitorado, e a segunda a avaliação de amidas e resultados da atividade esquistossomicida e da toxicidade do composto mais ativo desse estudo.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: i. obtenção de compostos com atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata* a partir do fracionamento cromatográfico biomonitorado de extratos e da avaliação de compostos isolados de espécies de *Piper* e, ii. avaliação da atividade esquistossomicida em miracídios e cercárias de *S. mansoni*, bem como da toxicidade em microcrustáceo *D. similis* e peixe *D. rerio* do composto mais promissor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Espécies vegetais e compostos

As espécies *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. hostmannianum* e *P. tuberculatum* foram coletadas no Herbário do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade de São Paulo, já a espécie *P. cuyabanum* em Itapetinga, BA. Os compostos dihidroflavocavaína C, pelitorina, piperina, piperlonguminina e piplartina foram cedidos pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato (Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo).

O composto 2',4',6'- Trihidroxidihidrochalcona foi isolado e cedido pelo Prof. Dr. Javier Rincón Veland, do Departamento de Farmácia da Universidad Nacional de Colombia.

Os compostos hidroquinona (Merck S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil) e ácido parahidroxibenzóico (Merck) são de origem sintética e comercializados, assim como a niclosamida (Bayer), composto utilizado como controle positivo em todos os ensaios.

As espécies, tipos de extratos, grupo químico e origem dos compostos avaliados neste estudo estão descritos nos quadros 6 e 7 respectivamente.

Os estudos de isolamento e a identificação dos compostos ativos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP em colaboração com o Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e Dra Lydia Fumiko Yamaguchi.

Quadro 6 - Espécies, partes das plantas e tipos de extração dos extratos avaliados quanto a atividade moluscicida em *B. glabrata*.

Espécie vegetal	Parte vegetal	Extrato
<i>Piper aduncum</i> L. ^a	folha	metanol
<i>Piper crassinervium</i> Kunth ^b	Folha	metanol acetato de etila água
	Flor	acetato de etila
<i>Piper cuyabanum</i> C.DC. ^c	Folha	metanol diclorometano
	Fruto	metanol diclorometano
	Raiz	metanol diclorometano
<i>Piper diospyrifolium</i> Kunth ^d	Folha	metanol acetato de etila
<i>Piper hostmannianum</i> R.S. ^e	Folha	metanol
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. ^{f*}	Folha	metanol
	Fruto	metanol
	Raiz	metanol
	Caule	metanol

^{a,d,e} Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ). Depósito no Herbário do Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ.

^{b,f} Identificação pelo Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru). Depósito no Herbário do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, IB-USP, São Paulo, SP.

^c Identificação realizada pelo Herbário da Ceplac em Itabuna, BA.

^a Exsicata (K-029)

^b Exsicata (K-084)

^c Exsicata (K-1163)

^d Exsicata (K-0431)

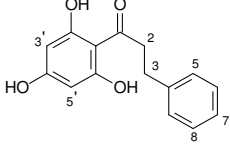
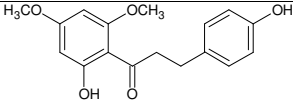

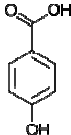
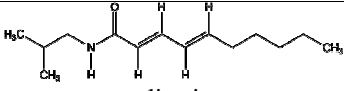
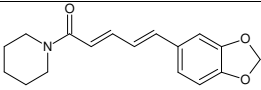
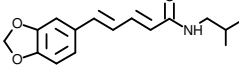
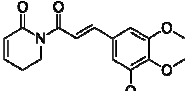
^e Exsicata (K-156)

^f Exsicata (K-169)

* Espécie utilizada para estudos de quimiometria.

Fonte: Rapado (2012).

Quadro 7 – Descrição e origem dos compostos avaliados quanto a atividade moluscicida em *B. glabrata*.

Composto e massa molar (g/mol)	Grupo químico	Espécie/Origem	Referência
 <p>2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona (258,26)</p>	chalcona	<i>Piper cumanense</i> H.B.K. ^a	Joshi et al. (2001)
 <p>dihidroflavocavaina C (302,32)</p>	chalcona	<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth ^b	Albiero et al. (2005)
 <p>hidroquinona¹ (110,03)</p>	quinona	Merck	---
 <p>ácido para-hidroxibenzóico¹ (138,12)</p>	ácido benzóico	Merck	---
 <p>pelitorina (223,19)</p>	amida	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. ^c	Marques et al. (2010)
 <p>piperina (285,34)</p>	amida	<i>Piper nigrum</i> L. ^c	Parmar et al. (1997)
 <p>piperlonguminina (273,13)</p>	amida	<i>Piper scutifolium</i> Yunck ^d	Marques et al. (2007)
 <p>piplartina (317,34)</p>	amida	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. ^c	Navickiene et al. (2000)

^a Identificação pelo Dr. Ricardo Callejas (Universidad de Antioquia, Colombia). Depósito no Herbário Nacional Colombiano, Universidad Nacional de Colombia. Exsicata COL 468660.

^b Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ). Exsicata K1539

^c Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ).

^d Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ).

^e Identificação pelo Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru). Depósito no Herbário do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, IB-USP, SP. Exsicata (K-169)

¹Composto comercial (Merck).

Fonte: Rapado (2012).

3.1.1 Seleção das espécies de *Piper* e dos compostos isolados

A escolha da espécie para o estudo de isolamento e identificação dos compostos ativos baseou-se nos resultados descritos por Rapado et al. (2010), que indicaram os extratos metanólicos das folhas de *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. cuyabanun*, *P. diospyrifolium* e *P. hostmannianum* como ativos em *B. glabrata* (Quadro 5). Partes vegetais dessas 5 espécies foram coletadas para a obtenção de extratos, confirmação da atividade em *B. glabrata* e escolha de uma espécie para o estudo de isolamento.

A busca de compostos moluscicida foi realizada em amidas e chalconas de *Piper*. As amidas foram selecionadas por ser em *Piper*, o grupo de compostos com atividade biológica mais representativa em organismos diversos (Quadro 4), e as chalconas escolhidas uma vez que o fracionamento biomonitorado realizado nesse estudo direcionou a busca de compostos ativos para esse grupo. Visando um possível estudo preliminar de relação entre estrutura química e atividade biológica, um ácido benzoico e uma quinona de origem sintética foram avaliados.

3.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir de folha, caule, fruto, flor e raiz de espécies de *Piper*, como indicado na Quadro 6. As partes foram coletadas, secas em estufa a 45 °C e moídas em moinho de facas. Cada material vegetal foi extraído três vezes com o solvente indicado na Quadro 6. Após a extração, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, em evaporadores Büchi, para a obtenção dos extratos.

3.2.1 Avaliação da atividade moluscicida dos extratos

Os extratos obtidos no item anterior foram avaliados em *B. glabrata* adultos (de acordo com a seção 3.8.1) em concentrações descritas como ativas, segundo Rapado et al., 2010 (Quadro 5) para a confirmação da atividade moluscicida e seleção de uma espécie para o fracionamento biomonitorado, isolamento e identificação dos compostos ativos.

3.3 Fracionamento biomonitorado de *P. diospyrifolium* em *B. glabrata*

Folhas de *P. diospyrifolium* (massa do vegetal seco 244,93 g) foram coletadas no período de verão e o extrato elaborado de acordo com o item 3.2. O extrato bruto (33,21 g) foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a obtenção do perfil fitoquímico da espécie e escolha das técnicas de fracionamento. Os perfis cromatográficos foram analisados em 237, 280, 330, 360 nm, comprimentos de onda que melhor caracterizaram o extrato.

O fracionamento de *P. diospyrifolium* foi realizado por técnicas cromatográficas usuais de separação descritas nas seções 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3. O monitoramento da atividade moluscicida das frações provenientes dos fracionamentos indicou quais frações seriam submetidas a posteriores processos de purificação.

3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises em CLAE foram obtidas em sistema Shimadzu LC 20AD – UFLC e utilizou-se como fase estacionária a coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 3 mm, 5µm) e fase móvel constituída por gradiente de MeOH/H₂O com 0,5% de ácido fórmico (Sigma – Aldrich). O sistema consistiu em 45 minutos de corrida com início de 30% de MeOH mantido por 30 minutos, seguido de 100% de MeOH por 10 minutos e 30% MeOH por 5 minutos.

Os perfis cromatográficos das frações obtidas nesse estudo foram analisados em 237, 280 e 330, 360 nm.

3.3.2 Cromatografia em coluna aberta (CC)

Para os fracionamentos por cromatografia em coluna (CC) em fase normal utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60, com partículas de 63-200 µm (Merck) e como fase móvel o sistema eluente de Hex e a AcOEt, com gradiente de polaridade crescente.

A cromatografia sob pressão ou “flash” foi realizada em sílica gel 60 com partículas de 40-60 µm (Merck).

3.3.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e analítica (CCDA)

Para análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas placas comerciais de sílica gel 60 F₂₅₄ sob suporte de alumínio, com espessura de 0,25 mm (Merck) e sistema eluente de Hex e AcOEt na proporção de 6:4.

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada em placas de vidro de 20 x 20 cm cobertas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (Kieselgel) com 1,0 mm de espessura e sistema eluente de Hex e AcOEt na proporção de 7:3. As placas foram analisadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

3.4 Monitoramento da atividade moluscicida das frações de *P. diospyrifolium*

As frações obtidas durante o fracionamento de *P. diospyrifolium* foram analisadas por CLAE e a atividade moluscicida biomonitorada em *B. glabrata* adulto em concentrações inferiores a 20 ppm, uma vez que o extrato metanólico das folhas de *P. diospyrifolium*, nesta concentração, causou 100% de mortalidade. A avaliação da atividade moluscicida foi realizada de acordo com a seção 3.8.1.

3.5 Identificação estrutural dos compostos ativos

A identificação estrutural dos compostos purificados foi realizada utilizando-se métodos espectroscópicos e espectrométricos. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em equipamentos Bruker AC200 (operando a 200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C) e DPX300 (operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C), utilizando-se clorofórmio deuterado (CDCl₃ - 99,8% Cambridge Isotopes Laboratories TM). As análises de massas foi realizada em um Bruker MicrOTOF-QII, no modo positivo, gás de nebulização 2 Bar, gás de secagem 8l/h e temperatura de secagem 200 °C. A voltagem do capilar foi de 4 kilo-volt (kV) e a energia de colisão de 8 elétron-volt (eV).

3.6 Solventes e reagentes

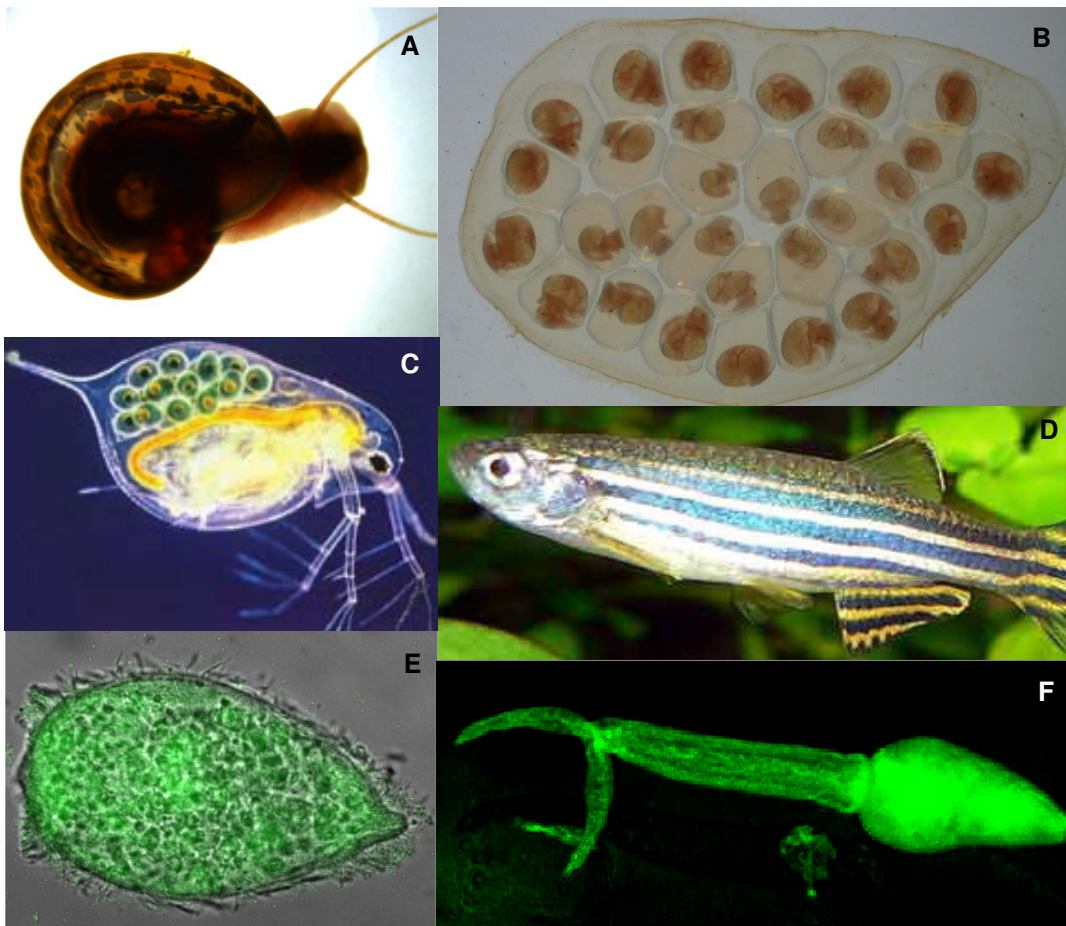
Os solventes de grau PA utilizados durante a extração e purificação foram fornecidos pela Synth e submetidos a destilação fracionada na Central de Solventes do IQ-USP. Para as análises cromatográficas foram utilizados solventes de grau cromatográfico da J. T. Baker.

O solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma–Aldrich) foi utilizado para solubilizar os extratos, frações e compostos.

3.7 Animais utilizados nesse estudo

Os caramujos adultos e embriões utilizados neste estudo pertencem à espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) selvagem, descendem de espécimes provenientes de Barreiro de Baixo, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Figura 13A-B). Os espécimes foram mantidos no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan em aquários de polietileno de 20 litros, contendo água dechlorada em temperatura controlada de 25°C, sob aeração e alimentados com alface in natura (SOUZA; LIMA, 1990).

Figura 13 - Animais utilizados nos ensaios de atividade biológica e toxicidade: A- *Biomphalaria glabrata* selvagem adulto, B- desova com embriões de *B. glabrata*, C- *Daphnia similis*, D- *Danio rerio*, E- miracídio de *Schistosoma mansoni* e F- cercaria de *S. mansoni*.



Fonte: Rapado (2012).

O ciclo do *Schistosoma mansoni*, linhagem de Belo Horizonte, MG, Brasil foi mantido no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, em hamsters (*Cricetus auratus*) e *B. glabrata*. Os miracídeos foram obtidos de ovos provenientes de fezes de hamsters infectados e as cercárias de caramujos experimentalmente infectados (Figura 13E-F) (SOUZA; LIMA, 1990).

Os ensaios de toxicidade foram realizados em microcrustáceo *Daphnia similis* (Figura 13C) e peixe *Danio rerio* (Figura 13D). Os microcrustáceos foram mantidos em incubadora Modelo Q 315 D26, Quimis a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz, no Laboratório de Ensaios Biológicos e Ambientais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN, Brasil (ABNT, 2004). Os peixes provieram de criadouro certificado de organismos para testes laboratoriais; os ensaios com este organismo foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan (ABNT, 2006).

3.8 Ensaios biológicos

A avaliação da atividade moluscicida foi realizada com base nas recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) para análise de moluscicidas sintéticos (WHO, 1965) e de plantas moluscicidas (WHO, 1983).

A niclosamida (moluscicida referência) foi utilizada como controle positivo em todos os ensaios biológicos.

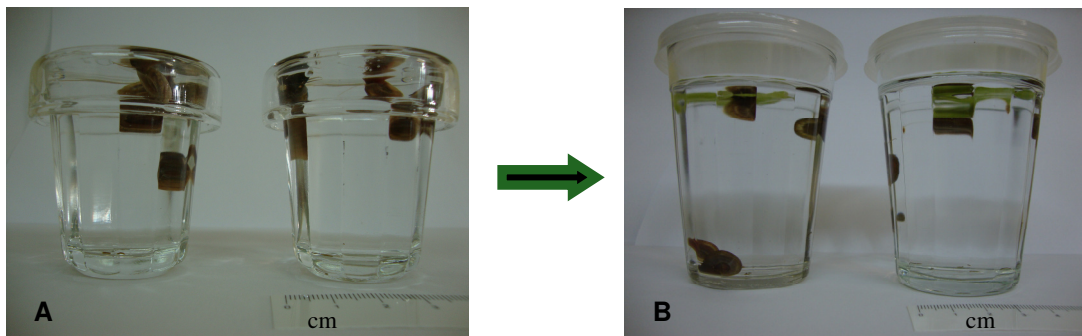
3.8.1 Avaliação da atividade moluscicida em *B. glabrata* adultos

Caramujos *B. glabrata* com diâmetro de 11 a 18 mm de concha foram expostos a extratos, frações e compostos previamente diluídos em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), inicialmente em concentrações inferiores a 1000 ppm quando extratos e inferiores a 20 ppm para frações e compostos. A escolha das concentrações para cada extrato/fração/composto seguiu critérios da OMS (1965), dados da literatura, bem como atendeu quesitos para a realização de estudos quimiométricos. Os compostos ativos em concentrações inferiores a 20 ppm foram submetidos à determinação das concentrações letais a 90% (CL₉₀) e 50% (CL₅₀) da população, descritos na seção 3.8.3.

Para cada concentração, 10 caramujos divididos em grupos de cinco foram expostos a 110 ml de solução dos extratos/frações/compostos por 24 horas, em recipientes de vidro cuja abertura foi tampada com uma placa de Petri para assegurar o contato dos caramujos com a

solução (Figura 14A). Após a exposição, os caramujos foram lavados com água filtrada e transferidos para recipientes de vidro com volume de 250 ml de água filtrada e observados por 7 dias (Figura 14B). A avaliação da atividade dos extratos/frações/compostos foi determinada pela morte dos animais, detectada por perda de movimento, liberação de hemolinfa, corpo e concha descolorados e ausência de batimentos cardíacos, visualizados sob microscópio estereoscópico. O controle negativo foi mantido em DMSO 1% e o controle positivo exposto a niclosamida. Os ensaios foram realizados com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 25 ± 1 °C.

Figura 14 - Ilustração da metodologia utilizada para a avaliação da atividade moluscicida dos extratos/frações/compostos. A- caramujos em grupos de cinco submersos em solução avaliada nesse estudo, durante 24 horas e B- caramujos mantidos em água filtrada por 7 dias para a observação diária.



Fonte: Rapado (2012).

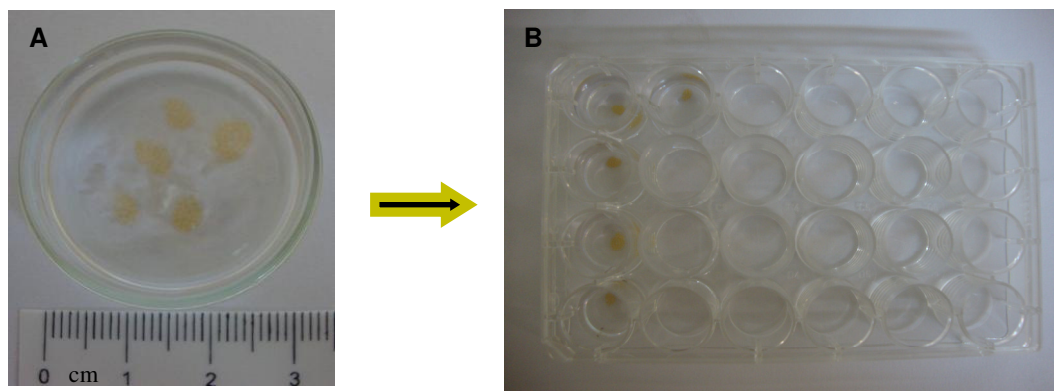
3.8.2 Avaliação da atividade moluscicida em embriões de *B. glabrata*

O estudo da atividade em embriões foi realizado em desovas de *B. glabrata* nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora e véliger (Figura 5). Para a obtenção das desovas com os estádios embrionários desejados foram colocadas nos aquários, folhas transparentes de polietileno que serviram de substrato para a oviposição dos caramujos. As desovas foram coletadas diariamente para a identificação sob microscópio estereoscópico dos estádios embrionários.

Cinco desovas de cada estágio embrionário, contendo pelo menos 10 embriões em cada desova foram expostas em placas de Petri, por 24 horas, aos compostos na concentração máxima de 100 ppm (Figura 15A). Ao final da exposição, as desovas foram lavadas e mantidas em água filtrada em placas de cultura de 24 poços por 7 dias para observação diária de mortes e malformações embrionárias inespecíficas (embriões com desenvolvimento

anormal), segundo parâmetros definidos por Camey (1970) e Kawano, Okazaki e Ré (1992) (Figura 15B). Os compostos ativos em concentrações inferiores a 20 ppm foram submetidos a determinação das CL_{90} e CL_{50} , descritos na seção 3.8.3. Foram realizados controles negativo com DMSO 1% e positivo com niclosamida.

Figura 15 - Ilustração da metodologia utilizada para a avaliação da atividade moluscicida dos compostos em embriões de *B. glabrata*. A- Cinco desovas expostas por 24 horas a um composto deste estudo e B- desovas mantidas em água filtrada em placa de 24 poços por 7 dias para a observação diária de mortes e malformações.



Fonte: Rapado (2012).

3.8.3 Determinação das concentrações letais a 90% (CL_{90}) e 50% (CL_{50}) da população em *B. glabrata* adultos e embriões

As CL_{90} e CL_{50} em *B. glabrata* adultos e embriões foram obtidas para compostos ativos e extratos de *P. tuberculatum* submetidos a análises quimiométricas. Assim, esses extratos/compostos foram avaliados em *B. glabrata* em concentrações inferiores a 100% letal até a obtenção das CL_{50} e CL_{90} de acordo com a metodologia das seções 3.8.1 e 3.8.2. Os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 30 caramujos e 15 desovas de cada estágio embrionário por concentração.

3.8.4 Avaliação da atividade esquistossomicida do composto mais ativo em miracídios e cercárias de *S. mansoni*

Miracídios e cercárias recém eclodidos e eliminados respectivamente foram coletados em 10 ml de água deionada e suas densidades iniciais determinadas pela contagem de três amostras de 1 ml cada. Conforme necessário, adicionou-se água deionada para a obtenção de

soluções contendo 50 cercárias ou miracídeos / ml. Ambos os organismos foram expostos ao composto mais ativo obtido neste estudo, em concentrações de 2 a 20 ppm, em placas de cultura de células, por 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. A mortalidade dos organismos foi avaliada em microscópio estereoscópico e classificada como: letalidade completa - 100% imóvel no fundo da placa; toxicidade forte - 90% imóvel no fundo da placa; toxicidade média - 50 a 90% imóvel e / ou no fundo da placa; e inativo - menos de 50% imóveis e / ou no fundo da placa, como descrito por Santos et al. (2007). O controle negativo foi mantido em DMSO 1% e o positivo em niclosamida na concentração de 0,3 ppm para miracídeos e 0,1 ppm para cercárias, como descrito por Andrews, Thyssen e Lorket (1983). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9 Avaliação da toxicidade do composto mais ativo

A toxicidade aguda do composto mais ativo deste estudo foi avaliada em *Daphnia similis* e *Danio rerio*. Os ensaios seguiram as normas ABNT NBR 12713 (2004a) e NBR 15088 (2006) e foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN em colaboração com a Profa Dra Sueli Ivone Borrely.

3.9.1 Toxicidade em microcrustáceo

Os ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2004a). As concentrações avaliadas do composto mais ativo e da niclosamida (utilizada como controle positivo) foram determinadas a partir de um ensaio preliminar que obteve as concentrações 100% letais aos microcrustáceos. A água utilizada para o preparo das soluções e controles proveio da represa Paiva de Castro (Mariporã – SP) e foram ajustadas a dureza total para 46 mg L⁻¹ de CaCO₃ e o pH para 7,0 ± 0,5.

Neonatos de *Daphnia similis* com idade entre 6 e 24 horas de vida foram expostos durante 48 horas a concentrações inferiores as 100% letais do composto mais ativo deste estudo e da niclosamida para a determinação das CE₅₀. Quatro réplicas com 5 organismos foram realizadas por concentração, totalizando 20 organismos. O resultado foi obtido pelo percentual de imobilidade dos organismos em função da concentração na qual se observou o efeito.

A leitura dos ensaios foi realizada com o auxílio de iluminação artificial, observando-se a imobilidade dos organismos expostos, que corresponde à impossibilidade do organismo se movimentar na coluna d'água, podendo ainda apresentar batimentos cardíacos. Foram considerados imóveis os organismos não capazes de nadar em um intervalo de 15 segundos (CETESB, 1986). A partir do número de organismos imóveis por concentração da amostra foram calculadas as concentrações nominais das amostras que causam imobilidade de 50% dos organismos.

Para os cálculos dos valores da concentração efetiva mediana que causa 50 % de imobilidade (CE_{50}) e intervalos de confiança foi aplicado o teste estatístico com o programa “Trimmed Spearman Karber”, com correção de Abbott (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977). O controle negativo foi realizado em DMSO 1%.

3.9.2 Toxicidade em vertebrado

A avaliação da toxicidade estática aguda foi realizada em peixe *Danio rerio* de acordo com a norma ABNT NBR 15088 (2006). Os ensaios foram realizados em recipientes de vidro com volume de solução de 2000 ml, em temperatura de 25 ± 1 °C, oxigenação constante e fotoperíodo de 14 horas de luz (Figura 16). Para o preparo das soluções e controles utilizou-se água sintética (água processada com ajustes de pH 7,0 – 7,5 e dureza de 40 - 48 mg /L $CaCO_3$). As concentrações do composto mais ativo e da niclosamida avaliadas foram determinadas a partir de um ensaio preliminar que determinou a menor concentração que causou 100% de mortalidade dos peixes para cada composto.

Dez peixes por concentração foram expostos ao composto mais ativo e à niclosamida em concentrações inferiores as 100% letais para a obtenção das CL_{50} . A taxa de mortalidade e alterações fisiológicas foram registradas após 30 min, 24 e 48 h de exposição. O controle negativo foi mantido em DMSO 1%.

Figura 16 – Ilustração da metodologia utilizada no ensaio de toxicidade aguda em *D. rerio*.



Fonte: Rapado (2012).

3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas desse estudo foram realizadas no Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr Carlos Alberto de Bragança Pereira.

Para os valores de CL_{90} e CL_{50} de *B. glabrata* adultos e embriões considerou-se o modelo linear generalizado com a variável $Y=1$ (morte) ou $Y=0$ vivo, e como covariável X as concentrações estudadas (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Foram utilizados quatro modelos (logito, probito, log-log e complementariedade log-log) para cada conjunto de dados e considerou-se o melhor aquele que apresentou menor Critério de Informação Akaike (AKAIKE, 1974; MCCULLAGH; NELDER, 1989). Para a obtenção dos intervalos de confiança utilizou-se o método de Bootstrap (EFRON; TIBSHIRANI, 1993). A análise estatística foi realizada utilizando o software R (TEAM, 2010).

Os valores de CE_{50} em *D. similis* e CL_{50} em *D. rerio* foram determinados pelo programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

3.10.1 Análise quimiométrica de Componente Principal (PCA) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

As análises quimiométricas deste estudo foram realizadas pelo Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti da Universidade Federal da Paraíba.

As Análises de Componente Principal (PCA) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foram realizadas a partir dos dados de atividade moluscicida dos extratos metanólicos de raízes, caules, frutos e folhas de *P. tuberculatum*, obtidos de acordo com o item 3.8.4, e seus dados de espectrometria de massas com ionização por electrospray e regiões integradas de ^1H RMN, obtidos de acordo com a seção 3.5.

A fim de corrigir a possível não reprodutibilidade associada aos processos de geração de headspace e do detector de massa, os sinais gerados (dados brutos) foram submetidos a um processo de normalização de área, que consistiu na área sob a curva tornar-se a mesma para todo o espectro (MA, 2008).

Para explicar as diferenças das concentrações de amostra, injeções e valores de CL_{50} (ppm), os valores das regiões integradas de RMN ^1H e a abundância de íons dos espectros de massa foram normalizados para a proporção normal de íons correntes e submetidos ao processo de escalonamento, em que a média foi subtraída dos valores do descritor e os valores resultantes divididos pelo desvio padrão. Para realizar as análises de PCA e PLS, cada variável, ou seja, cada região integrada de RMN ^1H e a proporção de m/z de cada amostra foi subtraída pela média variável; isto assegurou que todos os resultados fossem interpretáveis em termos de variação em torno da média. A validação cruzada leave-one-out foi realizada visando a robustez do modelo de PLS gerado.

4 RESULTADOS

4.1 Fracionamento biomonitorado, isolamento e identificação de compostos moluscicidas em *P. diospyrifolium*

4.1.1 Seleção da espécie *P. diospyrifolium* para a busca de compostos com atividade moluscicida

Os extratos brutos das espécies *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. cuyabanum*, *P. diospyrifolium* e *P. hostmannianum* foram avaliados em *B. glabrata* adultos para a confirmação da atividade moluscicida descrita anteriormente e seleção da espécie para a realização do fracionamento biomonitorado (Tabela 1).

Das 5 espécies apenas o extrato das folhas de *P. aduncum* não reproduziu o resultado obtido por Rapado et al. (2010) (Quadro 5), e assim como descrito anteriormente, os extratos das espécies *P. cuyabanum* e *P. diospyrifolium* foram os mais ativos.

Devido à disponibilidade de material para coleta, isolamento e identificação do(s) composto(s) ativo(s) a espécie *P. diospyrifolium* foi a selecionada para o estudo de fracionamento biomonitorado e identificação dos compostos com atividade moluscicida.

4.1.2 Análise cromatográfica do extrato bruto

O extrato metanólico das folhas de *P. diospyrifolium* foi analisado por CLAE e apresentou picos majoritários em aproximadamente 30 minutos de retenção nos quatro comprimentos de ondas analisados (237, 280 e 330, 360 nm). No comprimento de onda de 360 nm, além do pico majoritário houve a evidência de quatro outros picos obtidos nos tempos de 8 a 20 minutos de retenção (Figura 17).

Tabela 1 - Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* das espécies vegetais *P. aduncum*, *P. crassinervium*, *P. cuyabanum*, *P. diospyrifolium* e *P. hostmannianum*.

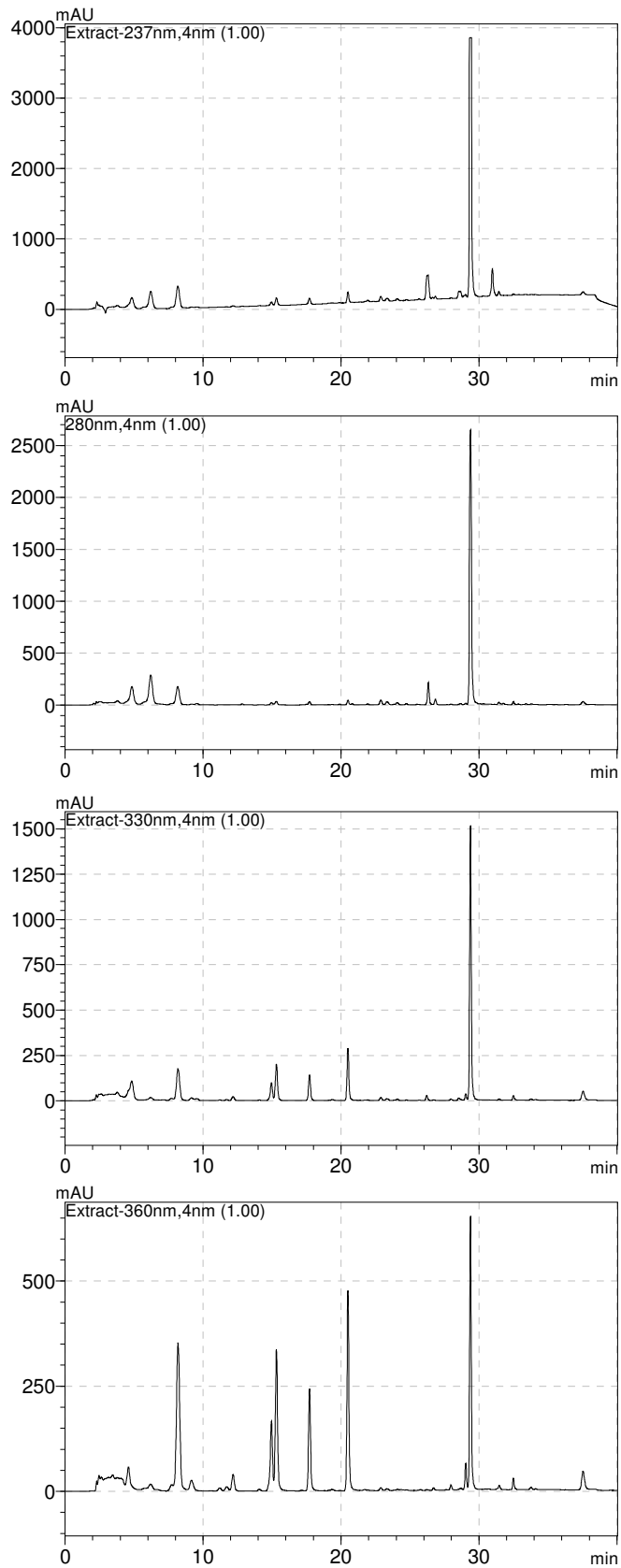
Espécie vegetal	Parte vegetal	Extrato	Concentração (ppm)	Mortos (%)	
<i>Piper aduncum</i> L	Folha	metanol	10	10	
<i>Piper crassinervium</i> Kunth	Inflorescência	acetato de etila	20	90	
			50	100	
			100	100	
	Folha	acetato de etila	20	80	
			50	100	
			100	100	
		metanol	20	70	
			50	90	
			100	100	
	Folha	água	20	10	
			50	30	
			100	20	
<i>Piper cuyabanum</i> C.DC.		Folha	metanol	10	30
				20	70
			diclorometano	10	90
	20			100	
	fruto	metanol	10	20	
			20	60	
		diclorometano	10	80	
			20	100	
	raiz	metanol	10	0	
			20	40	
		diclorometano	10	20	
			20	50	
<i>Piper diospyrifolium</i> Kunth	folha	metanol	10	40	
			20	100	
		acetato de etila	10	40	
			20	100	
<i>Piper hostmannianum</i> R.S.	folha	metanol	10	50	
			20	90	
			30	100	

n= 10 caramujos por concentração

Porcentagem de mortos ao final do 7º dia de observação

Fonte: Rapado (2012).

Figura 17 – Perfil cromatográfico do extrato metanólico de folhas de *P. diospyrifolium* obtidos por CLAE nos comprimentos de onda de 237, 280 e 330, 360 nm.

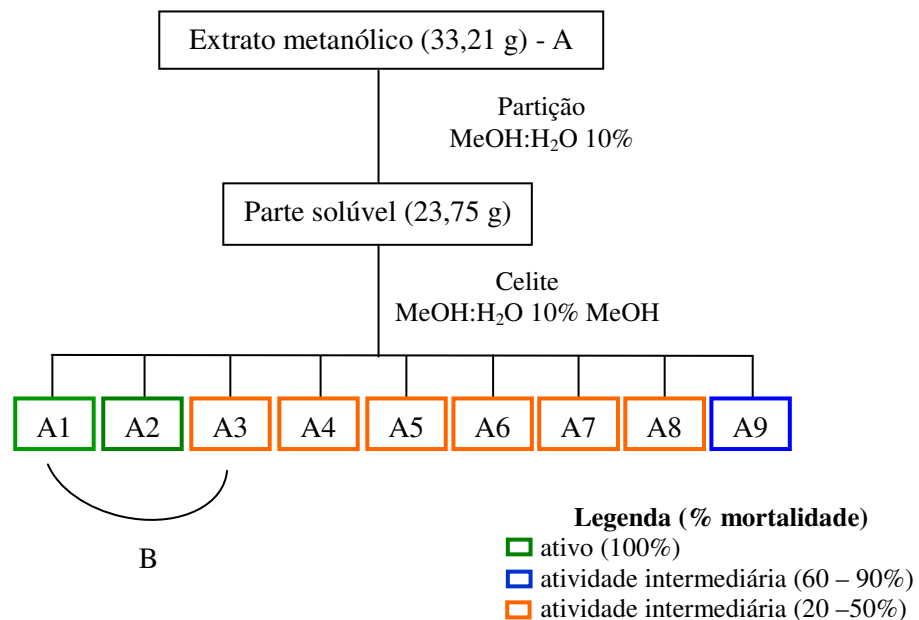


Fonte: Rapado (2012).

4.1.3 Fracionamento biomonitorado do extrato bruto de *P. diospyrifolium* em *B. glabrata*

O extrato metanólico foi solubilizado em MeOH:H₂O 10% e a parte solúvel obtida filtrada em celite com os solventes MeOH:H₂O 10% e MeOH obtendo-se 9 frações (A1 – A9). Todas as frações foram avaliadas em *B. glabrata* na concentração de 20 ppm e as mais ativas (100% mortalidade de *B. glabrata*) foram as frações A1 e A2 (Figura 18).

Figura 18 - Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico de folhas de *P. diospyrifolium* biomonitorado pela atividade moluscicida em *B. glabrata*, na concentração de 20 ppm.



Fonte: Rapado (2012).

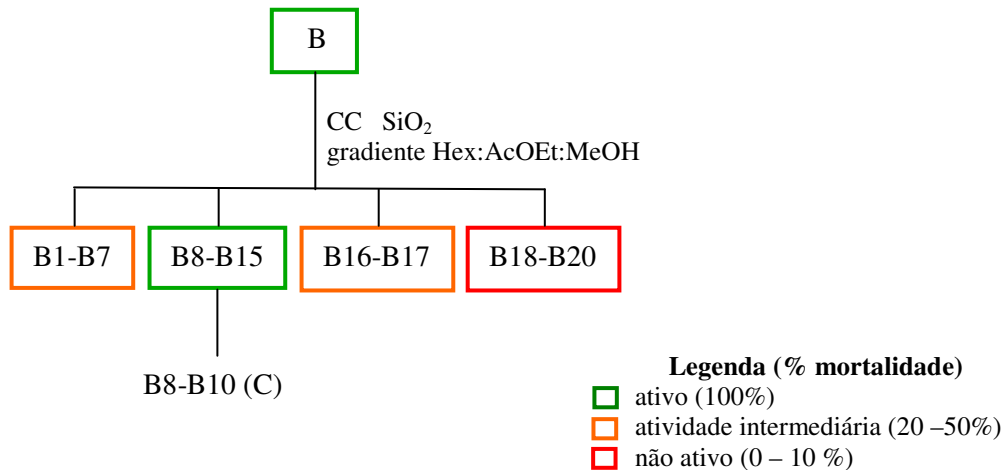
As frações A1 – A3, A4 – A7 e A8 – A9 apresentaram perfis semelhantes em análise por cromatografia em camada fina (CCD – alumínio, Sílica gel 60F₂₅₄) (APÊNDICE A). Assim, as frações A1-A3 foram reunidas e renomeadas B.

A fração B foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta com gel de sílica em fase normal, cujo sistema eluente foi uma mistura de Hex:AcOEt:MeOH com polaridade crescente, que originou 20 frações (B1 – B20) (Figura 19).

O perfil das frações foi analisado em CCD e as frações B2 - B3, B4 - B7, B9 - B10, B13 – B14, B16 – B17 e B19 - B20 apresentaram perfis semelhantes (APÊNDICE A). Todas as frações foram analisadas por CLAE (APÊNDICE B) e avaliadas em *B. glabrata* na concentração de 10 ppm. As frações ativas (100% de mortalidade) foram sequenciais de B8 -

B15. Devido a semelhanças nos perfis cromatográficos, as frações B8 – B10 foram reunidas e renomeadas de C.

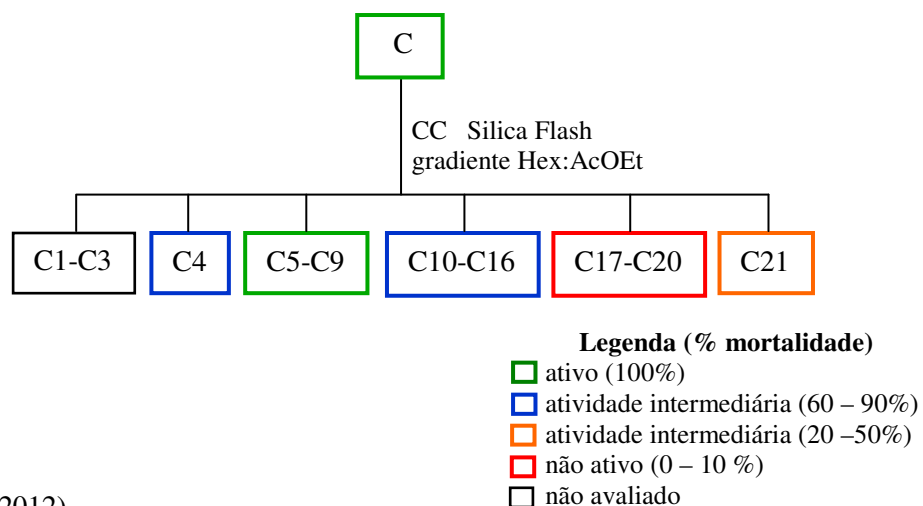
Figura 19 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração B biomonitorado pela atividade moluscicida em *B. glabrata* na concentração de 10 ppm.



Fonte: Rapado (2012).

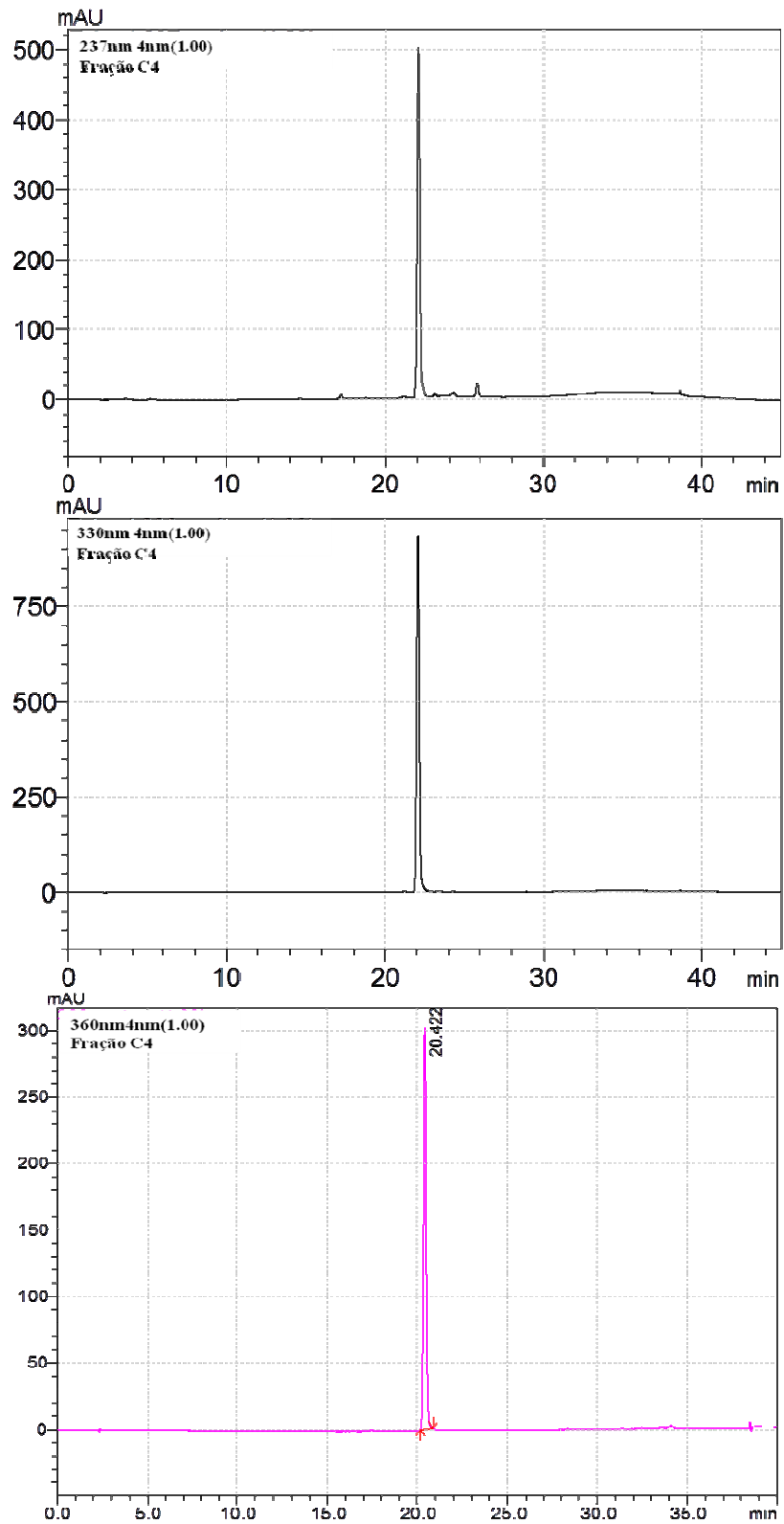
A fração C foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna aberta, com sílica Flash e sistema eluente de Hex:AcOEt com polaridade crescente, que originou 21 frações (C1 – C21). As frações foram analisadas em CCD (APÊNDICE A) e CLAE (APÊNDICE B), e posteriormente, a atividade moluscicida de cada fração (exceto C1 – C3 devido a ausência de massa para a realização do ensaio) foi avaliada na concentração de 10 ppm (Figura 20).

Figura 20 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração C e o biomonitoramento em *B. glabrata* das frações na concentração de 10 ppm.



Fonte: Rapado (2012).

Figura 21 - Cromatograma da fração C4 obtido por CLAE (λ 237/330/360) com pico correspondendo a flavocavaína A.

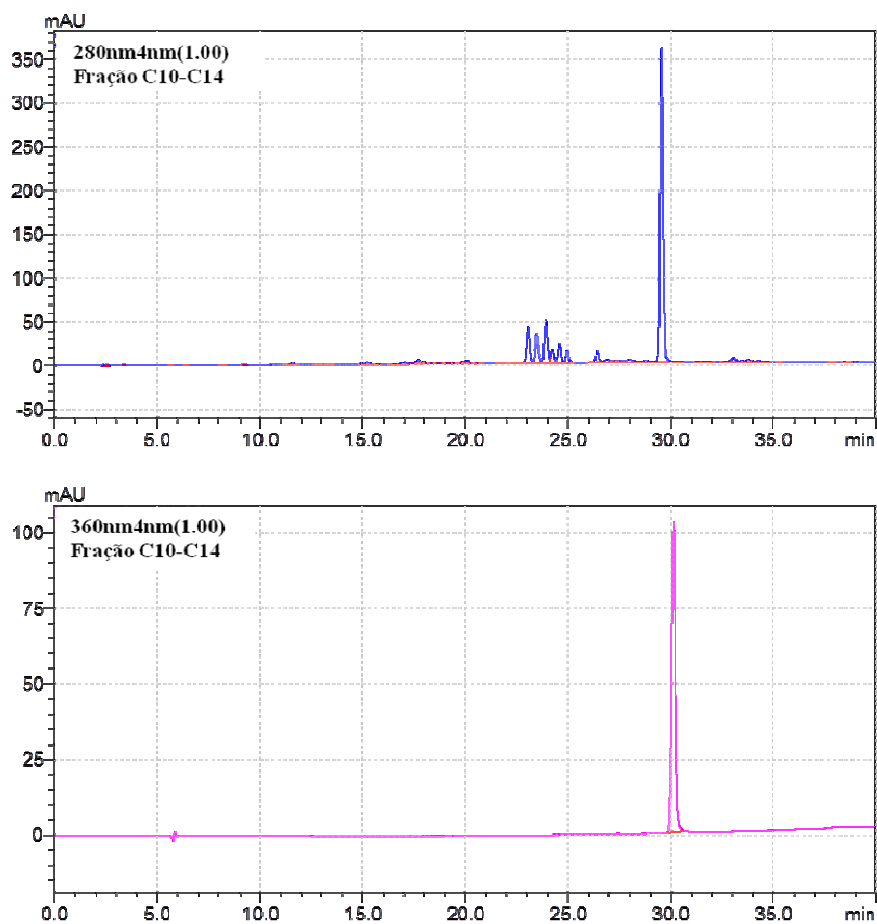


Fonte: Rapado (2012).

A fração C4 analisada por CLAE apresentou pico majoritário em aproximadamente 20 minutos (Figura 21). A fração foi filtrada em filtro Sep-Pak C18 e submetida a análises espectroscópicas que indicaram a caracterização molecular de uma flavocavaína (descrita na seção 4.1.4) (Figura 24).

As análises por CLAE indicaram que o pico majoritário em aproximadamente 30 minutos, descrito no extrato bruto estava presente nas frações ativas C5 - C9 (100% mortalidade), bem como nas frações com atividade moluscicida intermediária C10 - C14 (60 a 90% mortalidade) (APÊNDICE B). Devido os cromatogramas das frações C10 - C14 (Figura 22) indicarem maior pureza do composto referente ao pico em 30 minutos, estas frações foram selecionadas para o prosseguimento dos estudos.

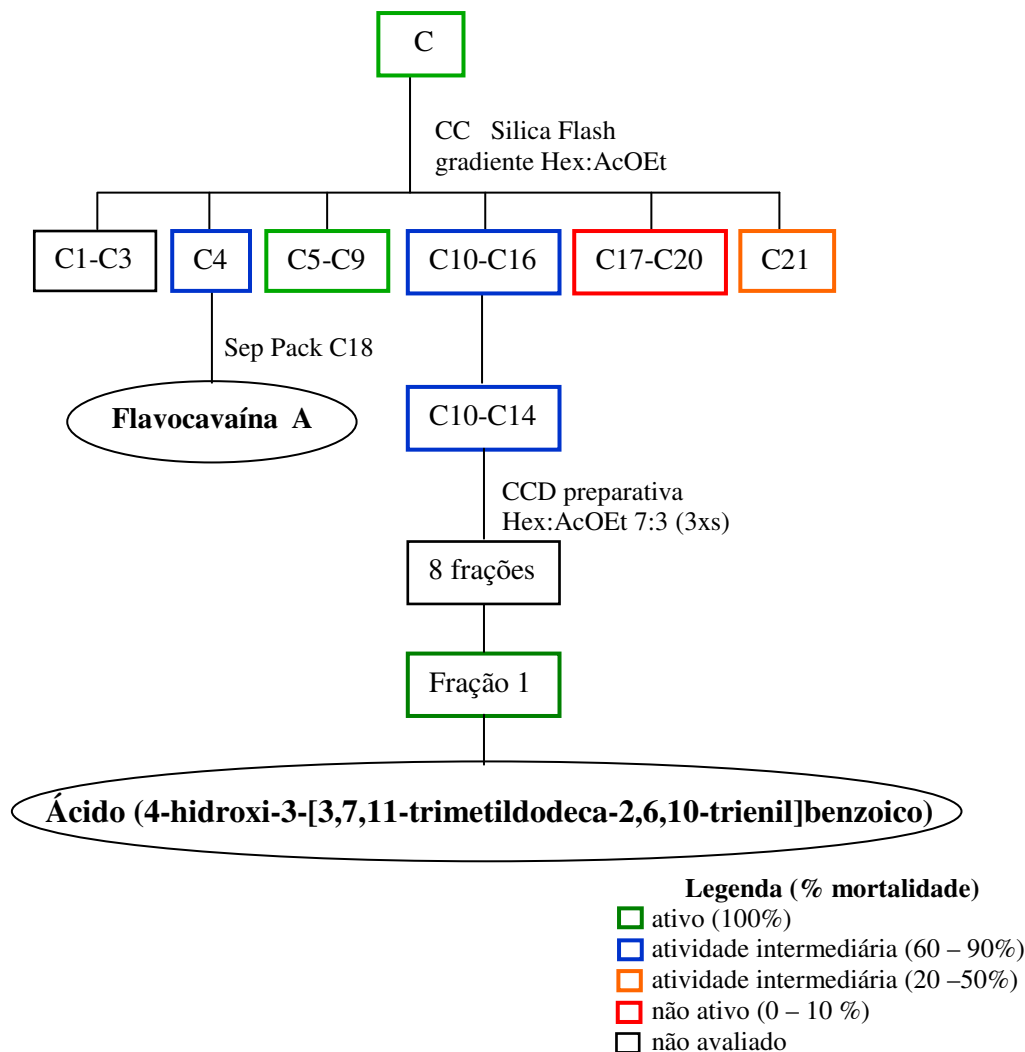
Figura 22 - Cromatograma da fração C10 - 14 obtido por CLAE (λ 280/360) com pico majoritário correspondendo ao derivado de ácido benzóico prenilado (4-hidroxi0-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil]benzoico).



Fonte: Rapado (2012).

As frações C10 – C14 foram reunidas e submetidas a purificação por CCD preparativa em sílica gel 60 PF₂₅₄ com fase móvel Hex:AcOEt (7:3), obtendo-se 8 frações, destas a fração 1 foi 100% ativa na concentração de 10 ppm e submetida a análises espectroscópicas que indicaram a caracterização molecular de um derivado de ácido benzóico prenilado (descrito na seção 4.1.4) (Figura 25).

Figura 23 – Fluxograma do fracionamento biomonitorado em *B. glabrata* na concentração de 10 ppm e do isolamento da flavocavaína A e do ácido (4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil]benzoico).



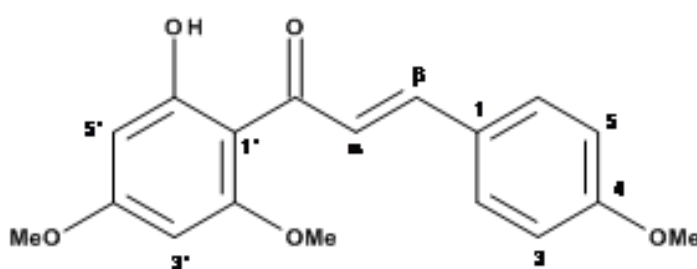
Fonte: Rapado (2012).

Os compostos isolados e identificados nesse estudo possuem pureza superior a 90% e ambos os compostos flavocavaína A e ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico foram submetidos a determinação das CL₅₀ e CL₉₀ em adultos e embriões de *B. glabrata*.

4.1.4 Identificação estrutural dos compostos ativos

A identificação estrutural da flavocavaína A (Figura 24) e do 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico (Figura 25) foi realizada a partir das análises dos espectros de massa, dados obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 2 e APÊNDICE C) e dados da literatura, para a flavocavaína A (PARMAR et al., 1997; RAMZAN; TRAN, 2004).

Figura 24 - Estrutura química e dados moleculares da flavocavaína A, isolada de folhas de *P. diospyrifolium*.



Nome químico: (E)-3-(4-metoxifenil)-1-(2,4-bismetoxi-6-hidroxifenil) propano

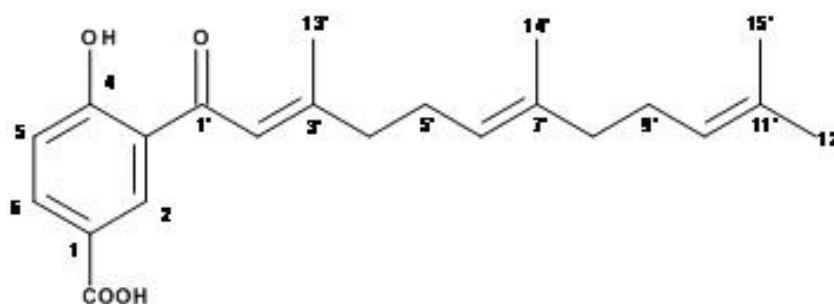
Fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$

Massa molecular calculado $[\text{M}+\text{H}]^+ = 315,1227$

Massa molecular obtido $[\text{M}+\text{H}]^+ = 315,1231$

Fonte: Rapado (2012).

Figura 25 - Estrutura do 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, isolado de folhas de *P. diospyrifolium*.



Nome químico: 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico

Formula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$

Massa molecular calculado $[\text{M}+\text{H}]^+ = 357,2060$

Massa molecular obtido $[\text{M}+\text{H}]^+ = 357,2060$

Fonte: Rapado (2012).

A descrição do composto 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico indicado na Figura 25 é inédita na literatura, sendo assim a determinação estrutural deste composto deve ser realizada utilizando-se RMN 1D e 2D. Neste estudo realizou-se a RMN 1D ^1H e ^{13}C no 300 MHz e posteriormente será realizado a RMN ^1H e ^{13}C no 500 MHz e também o 2D (essas análises não foram realizadas devido quantidade de amostra insuficiente e degradação rápida da amostra).

Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da flavocavaína A e do 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico.

Posição	flavocavaína A		4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico	
	^1H [m, J (Hz)]	^{13}C	^1H [m, J (Hz)]	^{13}C
1	----	127,77	----	120,31
2	7,57 (2H, d, 2; 6)	130,15	8,59 (1H, d, 2,0)	133,16
3	6,93 (2H, d, 2; 6)	114,38	----	119,70
4	----	161,38	----	167,90
5	6,93 (2H, d, 2; 6)	114,38	7,03 (1H, d, 10,0)	119,01
6	7,57 (2H, d, 2; 6)	130,15	8,16 (1H, dd, 2,0,10,0)	137,17
1'	----	127,82	----	195,63
2'	----	166,05	6,87 (1H, s)	118,80
3'	5,96 (1H, d, 2)	91,26	----	164,10
4'	6,11 (1H, d, 4)	162,48	2,37(2H, m)	42,11
5'	----	93,82	2,04 (2H, m)	26,81
6'	----	168,37	5,17 (1H, m)	127,70
7'	----	----	----	136,82
8'	----	----	2,37 (2H, m)	39,79
9'	----	----	2,04 (2H, m)	26,30
10'	----	----	5,09 (1H, m)	124,30
11'	----	----	----	131,57
12'	----	----	1,65 (3H, s)	25,91
13'	----	----	2,26 (3H, s)	20,57
14'	----	----	1,65 (3H, s)	16,28
15'	----	----	1,57 (3H, s)	17,80
α	7,80 (1H, s)	142,54	----	----
β	7,80 (1H, s)	125,12	----	----
4 OMe	3,92 (3H, s)	55,86	----	----
2' OMe	3,84 (3H, s)	55,42	----	----
4' OMe	3,86 (3H, s)	55,86	----	----
C=O	----	192,63	----	----
COOH	----	----	13,49 (1H, s)	170,90

s-simpleto

d-dupleto

m-multipleto

J-constante de acoplamento de Hz

Hz-Hertz

Fonte: Rapado (2012).

O fracionamento biomonitorado em *P. diospyrifolium* resultou no isolamento de dois compostos com atividade moluscicida: a chalcona flavocavaína A e o derivado de ácido benzoico 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico. Como parte de um estudo visando a obtenção de compostos ativos em *B. glabrata*, duas outras chalconas isoladas de *Piper*, de estrutura química semelhante a flavocavaína A foram avaliadas em adultos e embriões *B. glabrata*: a 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona e dihidroflavocavaina C (Tabela 3). Visando uma possível compreensão inicial da relação entre a estrutura química e a atividade moluscicida em ácidos benzoicos, a hidroquinona e o ácido para-hidroxibenzóico de origem sintética foram avaliados em *B. glabrata* adultos e embriões (Tabela 3).

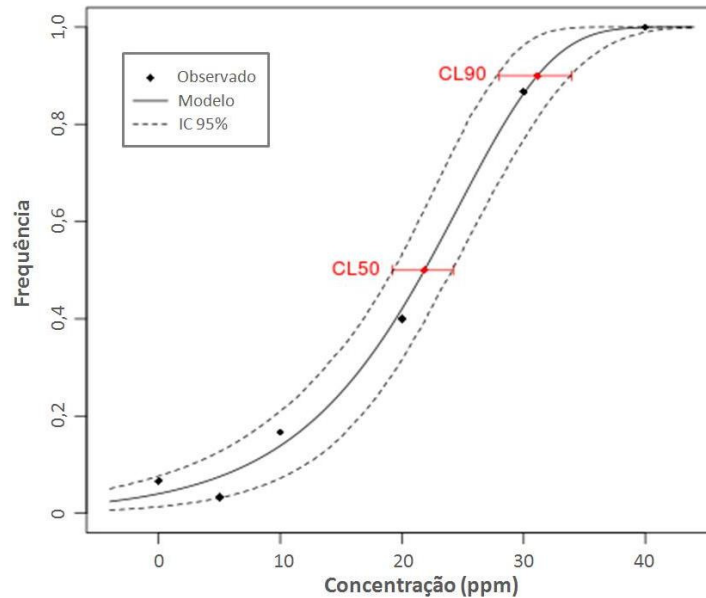
4.1.5 Avaliação da atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata* das chalconas flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona e dihidroflavocavaina C, do ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, ácido para-hidroxibenzóico e quinona.

Os compostos flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona, dihidroflavocavaina C, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, ácido para-hidroxibenzóico e quinona foram avaliados em *B. glabrata* adultos e embriões e os resultados encontram-se descritos nas Tabelas 3 e 4.

A flavocavaína A na concentração de 40 ppm causou 100% de mortalidade dos caramujos adultos durante as 24 horas de exposição. Nas concentrações inferiores, as porcentagens de mortes foram menores que 90% e ocorreram durante os 7 dias de observação (Figura 26). A flavocavaína A foi avaliada em embriões de *B. glabrata* na concentração de 100 ppm e não apresentou efeito ovicida em nenhum estágio embrionário (Tabela 3).

A chalcona diidroflavocavaina C não foi ativa em *B. glabrata* adultos e embriões (Tabela 3), diferente da 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona que causou a morte dos embriões em todos os estágios de desenvolvimento, sendo mais ativa em adultos (CL₉₀ 6,47 ppm) (Figura 27 e Tabela 4) do que em embriões (valores de CL₉₀ entre 13,54 – 14,87 ppm nos quatro estágios embrionários) (Figura 29, Tabela 4).

Figura 26 - Mortalidade de *B. glabrata* adultos expostos à flavocavaína A. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo complementar log-log), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.

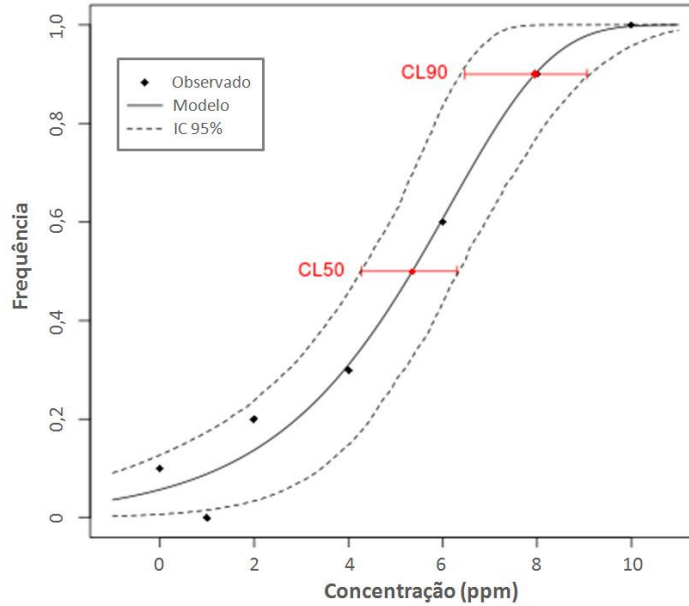


Fonte: Rapado (2012).

Os embriões expostos a 2',4',6'- triidroxidihidrochalcona nas concentrações de 15 e 10 ppm, nos quatro estádios embrionários, apresentaram somente atraso no desenvolvimento e ao final do estudo (7º dia), os embriões não haviam completado seu desenvolvimento e por isso não haviam eclodido. Devido a esse fato, estes embriões foram observados diariamente até o 16º dia após a exposição a 2',4',6'- triidroxidihidrochalcona. Notou-se que os embriões completaram o desenvolvimento, mantinham batimentos cardíacos, porém não saíram do interior da desova (Figura 28), o que resultou na morte dos embriões 16 dias após a exposição a 2',4',6'- triidroxidihidrochalcona.

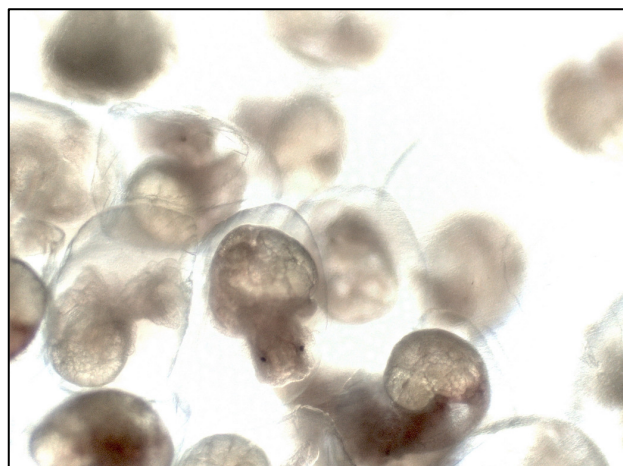
Os ensaios com a chalcona 2',4',6'- triidroxidihidrochalcona não foram realizados em triplicata a disponibilidade de composto em quantidade suficiente e tempo hábil para isolamento.

Figura 27 - Mortalidade de *B. glabrata* adultos expostos chalcona 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo complementar log-log), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.



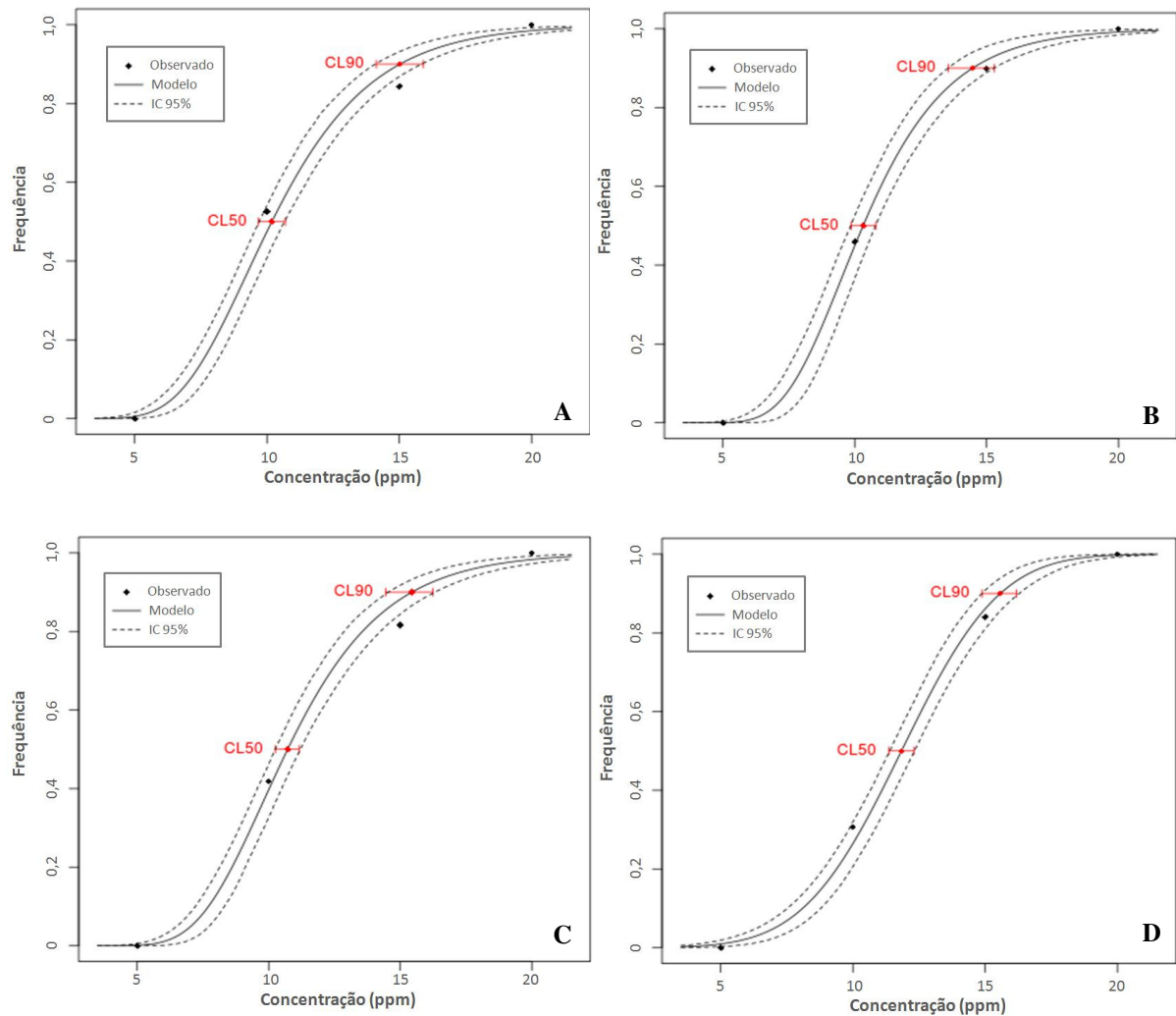
Fonte: Rapado (2012).

Figura 28 – Embriões de *B. glabrata* no interior da desova, com desenvolvimento embrionário completo e vivos após 12 dias de exposição a 15 ppm de 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona.



Fonte: Rapado (2012).

Figura 29 - Mortalidade de embriões de *B. glabrata* nos estádio de A- blástula, B- gástrula, C- trocófora e D- véliger expostos chalcona 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelos log-log e probito), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.



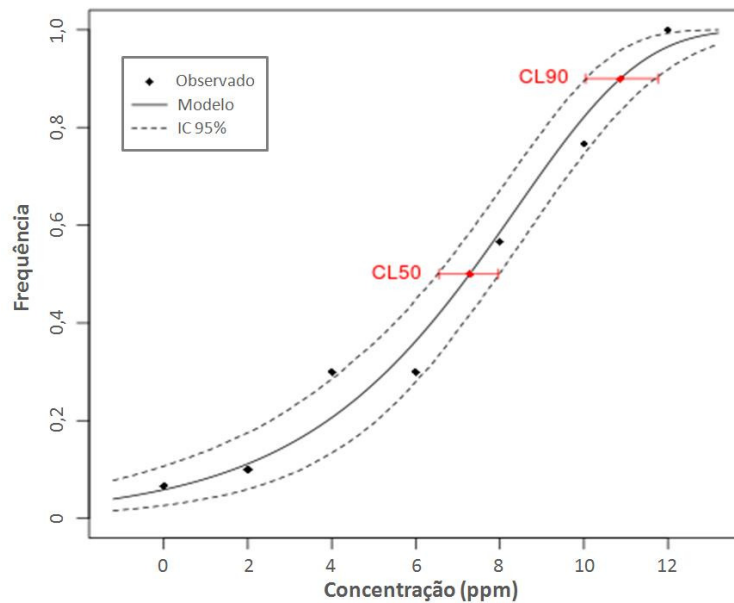
Fonte: Rapado (2012).

Das três chalconas avaliadas neste estudo a 2',4',6'- triidroxidihidrochalcona foi a mais ativa em adultos de *B. glabrata* (CL_{90} 6,47 ppm) e a única que causou a morte de embriões de *B. glabrata* (Tabelas 3 e 4).

O ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico foi ativo em caramujos a 12 ppm, concentração que causou 100% de mortalidade dos animais durante as 24 horas de exposição. As concentrações inferiores a 10 ppm causaram mortalidade em níveis inferiores a 80% e ocorreram durante os 7 dias de observação (Figura 30). Assim como a

flavocavaína A, o ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico não foi ativo em embriões de *B. glabrata* na concentração avaliada de 20 ppm (Tabela 3).

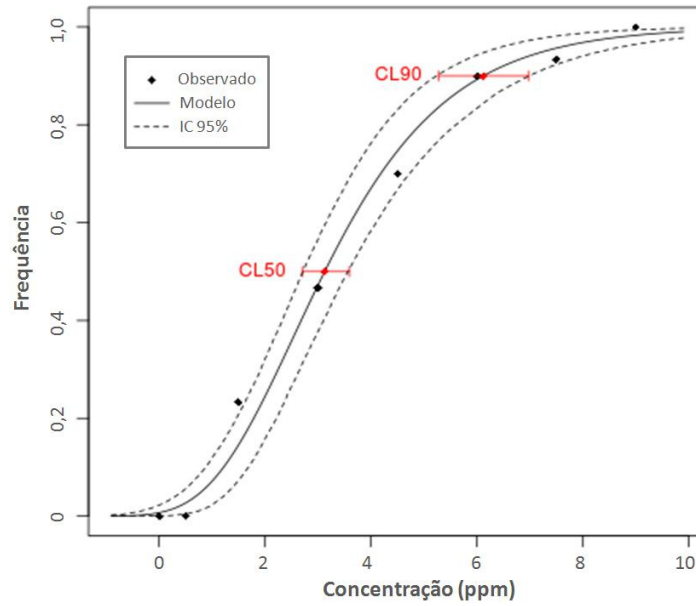
Figura 30 - Mortalidade de *B. glabrata* adultos expostos ao ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo complementar log-log), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.



Fonte: Rapado (2012).

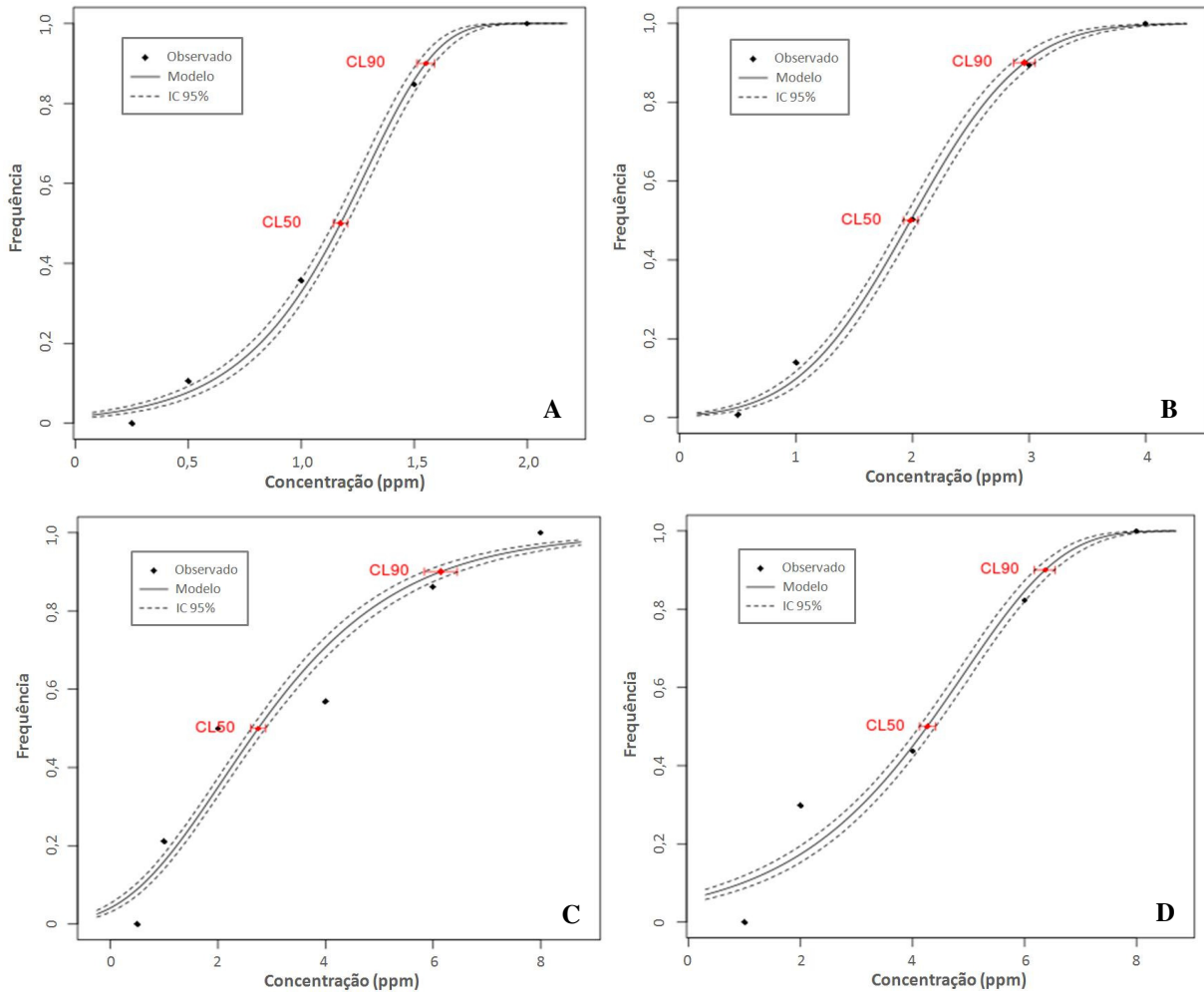
O ácido para-hidroxibenzóico não foi ativo em adultos e embriões de *B. glabrata* (Tabela 3). Já a hidroquinona foi ativa em caramujos adultos e embriões em concentrações semelhantes; 100% de mortalidade foi obtida em adultos na concentração de 9 ppm e em embriões nos estádios de trocófora e véliger a 8 ppm (Tabela 3, Figuras 31 e 32). Houve uma diferença na sensibilidade à hidroquinona entre os estádios embrionários, sendo os estádios de blástula e gástrula mais sensíveis com 100% de mortalidade nas concentrações de 2 e 4 ppm respectivamente (Tabela 3 e Figura 32).

Figura 31 - Mortalidade de *B. glabrata* adultos expostos a hidroquinona. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo complementar log-log), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.



Fonte: Rapado (2012).

Figura 32 - Mortalidade de embriões de *B. glabrata* nos estádio de A- blástula, B- gástrula, C- trocófora e D- véliger expostos a hidroquinona. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelos complementar log-log, probito e log-log), dados observados e intervalos de confiança das concentrações letais 50% e 90%.



Fonte: Rapado (2012).

Tabela 3 - Atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata* dos compostos flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxi-dihidrochalcona, dihidroflavocavaina C, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, quinona e ácido para-hidroxibenzóico.

(continua)

	Caramujos adultos		Embriões			
	Concentração (ppm)	Mortos (%)		Concentração (ppm)	Nº de embriões	Nº de mortos
flavocavaína A	0*	2 (6,6)	Blástula	0*	107	0
	5	1 (3,3)		20	129	0
	10	5 (33,3)	Gástrula	0*	102	0
	20	12 (66,6)		20	105	0
	30	26 (86,6)	Trocófora	0*	115	0
40	30 (100)	20		142	0	

Tabela 3 - Atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata* dos compostos flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona, dihidroflavocavaina C, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, quinona e ácido para-hidroxibenzóico.

(continuação)

	Caramujos adultos		Embriões			
	Concentração (ppm)	Mortos (%)		Concentração (ppm)	Nº de embriões	Nº de mortos
flavocavaína A			Véliger	0*	127	0
				20	117	0
2',4',6'-Trijidroxidihidrochalcona¹	0*	1	Blástula	0*	119	0
	1	0		5	102	0
	2	2 (20)		10	116	61 (52,5)
	4	3 (30)		15	134	113 (84,3)
	6	6 (60)		20	162	162 (100)
	8	9 (90)	Gástrula	0*	110	0
	10	10 (100)		5	112	0
				10	124	57 (45,9)
				15	119	107 (89,9)
				20	131	131 (100)
		Trocófora	0*	107	0	
			5	128	0	
			10	148	62 (41,8)	
			15	98	80 (81,6)	
			20	171	171 (100)	
		Véliger	0*	109	0	
			5	137	0	
			10	114	35(30,7)	
			15	144	121 (84)	
			20	124	124 (100)	
dihidroflavocavaina C¹	0*	0	Blástula	0*	98	0
	20	5 (50)		20	102	0
			Gástrula	0*	86	0
				20	115	0
			Trocófora	0*	98	0
				20	113	0
			Véliger	0*	98	0
				20	122	0
4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico	0*	2	Blástula	0*	113	0
	2	3 (10)		20	94	0
	4	9 (30)	Gástrula	0*	113	0
	6	9 (30)		20	114	0
	8	17 (56,6)	Trocófora	0*	99	0
	10	23 (76,6)		20	91	0
	12	30 (100)	Véliger	0*	111	0

Tabela 3 - Atividade moluscicida em adultos e embriões de *B. glabrata* dos compostos flavocavaína A, 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona, dihidroflavocavaina C, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico, quinona e ácido para-hidroxibenzóico.

(conclusão)

	Caramujos adultos		Embriões			
	Concentração (ppm)	Mortos (%)		Concentração (ppm)	Nº de embriões	Nº de mortos
				20	117	0
Hidroquinona	0*	0	Blástula	0*	302	0
	0,5	0		0,25	375	0
	1,5	7 (23,3)		0,5	369	39 (10,5)
	3	14 (46,6)		1,0	386	138 (35,7)
	4,5	21 (70)		1,5	406	344 (84,7)
	6	27 (90)		2,0	442	442 (100)
	7,5	28 (93,3)		Gástrula	0*	302
	9	30 (100)	0,5		403	3 (0,7)
			1,0		337	47 (13,9)
			2,0		340	171 (50,2)
			3,0		369	330 (89,4)
			4,0		440	440 (100)
			Trocófora		0*	387
				0,5	400	0
		1,0		408	86 (21,0)	
		2,0		460	230 (50)	
		4,0		373	212 (56,8)	
		6,0		440	379 (86,1)	
		8,0		368	368 (100)	
		Véliger	0*	301	0	
			1,0	385	0	
			2,0	433	129 (29,7)	
			4,0	398	294 (73,8)	
			6,0	351	289 (82,3)	
			8,0	407	407 (100)	
ácido para-hidroxibenzóico¹	0*		0	Blástula	0*	114
	20	0	20		132	0
			Gástrula	0*	115	0
				20	155	0
			Trocófora	0*	102	0
				20	114	0
			Véliger	0*	115	0
				20	102	0

[] intervalo de confiança de 95%

n= 30 caramujos e 15 desovas por concentração/¹n= 10 caramujos e 5 desovas por concentração

* 0 = controle negativo - DMSO 1%

Número de mortos ao final do 7º dia de observação

Fonte: Rapado (2012).

Tabela 4 - Valores das concentrações letais a 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) da população de *B. glabrata* adultos e embriões expostos aos compostos flavocavaína A, 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico e hidroquinona.

		Adultos	Estádios embionários			
			Blástula	Gástrula	Trocófora	Véliger
flavocavaína A	CL ₅₀	21,85	na	na	na	na
	(ppm)	[19,22-24,21]				
	CL ₉₀	27,97	na	na	na	na
	(ppm)	[27,97-33,95]				
4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico	CL ₅₀	7,28	na	na	na	na
	(ppm)	[6,54-7,96]				
	CL ₉₀	10,04	na	na	na	na
	(ppm)	[10,04-11,76]				
2',4',6'-trihidroxi dihidrochalcona¹	CL ₅₀	5,35	10,18	10,31	10,71	11,83
	(ppm)	[4,28-6,30]	[9,68-10,69]	[9,86-10,79]	[10,24-11,16]	[11,35-12,31]
	CL ₉₀	6,47	14,12	13,54	14,44	14,87
	(ppm)	[6,47-9,06]	[14,12-15,90]	[13,54-15,28]	[14,44-16,23]	[14,87-16,19]
hidroquinona	CL ₅₀	3,12	1,17	1,98	2,74	4,26
	(ppm)	[2,70-3,59]	[1,14-1,20]	[1,92-2,04]	[2,60-2,89]	[4,12-4,41]
	CL ₉₀	5,27	1,51	2,86	5,83	6,17
	(ppm)	[5,27-6,97]	[1,51-1,59]	[2,86-3,05]	[5,83-6,45]	[6,17-6,54]

na – não ativo

[] intervalo de confiança de 95%

Valores obtidos ao final do 7º dia de observação

Fonte: Rapado (2012).

4.2 Avaliação das atividades moluscicida, esquistossomicida e da toxicidade de amida de *Piper*

4.2.1 Avaliação da atividade moluscicida em *B. glabrata* adultos e embriões de amidas de *Piper*

Das quatro piperamidas pelitorina, piperina, piperlonguminina e piplartina avaliadas, apenas a piplartina foi 100% ativa em caramujos adultos e embriões na concentração de 20 ppm (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade moluscicida em caramujos adultos e embriões de *B. glabrata* de amidas isoladas de *Piper*.

(continua)

	Caramujos adultos			Embriões				
	Concentração (ppm)	Mortos (%)		Concentração (ppm)	Nº de embriões	Nº de mortos		
Pelitorina	0*	1	Blástula	0*	102	0		
				20	131	0		
				Gástrula	0*	102	0	
					20	91	0	
				Trocófora	0*	117	0	
					20	122	0	
				Véliger	0*	109	0	
					20	143	0	
	Piperina	0*	0	Blástula	0*	110	0	
					20	111	0	
					Gástrula	0*	97	0
						20	90	0
				Trocófora	0*	90	0	
					20	129	0	
				Véliger	0*	103	0	
					20	136	0	
Piperlonguminina		0*	0	Blástula	0*	102	0	
					20	114	0	
					Gástrula	0*	102	0
						20	125	0
				Trocófora	0*	95	0	
					20	147	0	

Tabela 5 - Atividade moluscicida em caramujos adultos e embriões de *B. glabrata* de amidas isoladas de *Piper*.

(conclusão)

	Caramujos adultos		Embriões			
	Concentração (ppm)	Mortos (%)		Concentração (ppm)	Nº de embriões	Nº de mortos
			Véliger	0*	100	0
				20	105	0
piplartina ¹	0*	0	Blástula	0*	312	0
	1	2 (6,6)		0,25	330	25 (7,5)
	2	2 (6,6)		0,5	320	135 (42,1)
	3	7 (23,3)		1	295	151 (51,1)
	4	7 (23,3)		1,2	296	296 (100)
	5	9 (30)	Gástrula	0*	310	0
	6	14 (46,7)		0,5	397	26 (6,5)
	7	21 (70)		1	337	27 (8,0)
	7,2	26 (86,6)		2	233	88 (37,7)
	7,4	26 (86,6)		2,2	389	389 (100)
	7,6	28 (96,3)	Trocófora	0*	309	0
	7,8	29 (96,6)		1	313	1 (0,3)
	8	30 (100)		2	312	13 (4,1)
				3	322	97 (30,1)
				3,2	404	250 (61,8)
				3,4	327	315 (96,3)
				3,6	335	335 (100)
			Véliger	0*	311	0
				1	349	0
				2	304	5 (1,6)
				3	200	3 (1,5)
				4	363	223 (61,4)
				4,2	352	210 (59,6)
				4,4	393	363 (92,3)
				4,6	355	345 (97,1)
				4,8	288	269 (93,4)
				5	310	310 (100)

n = 10 caramujos e 5 desovas por concentração

¹n = 30 caramujos e 15 desovas por concentração

* 0 = controle negativo - DMSO 1%

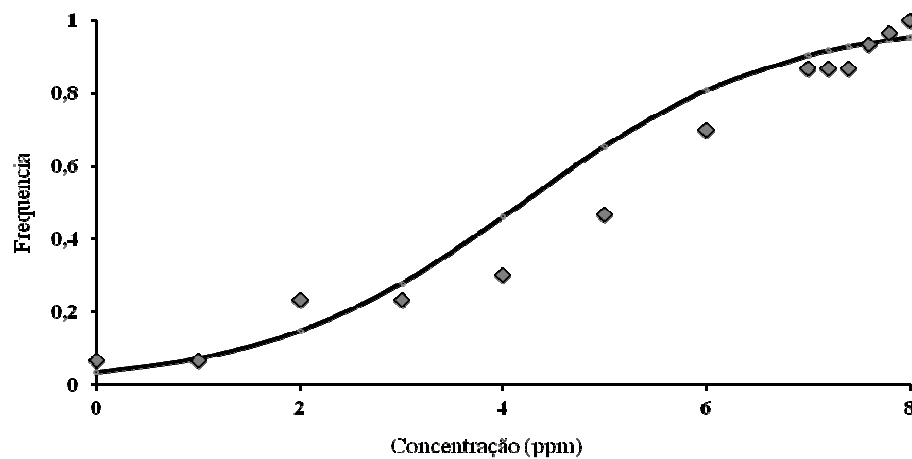
[] intervalo de confiança de 95%

Número de mortos ao final do 7º dia de observação

Fonte: Rapado (2012).

Para a determinação das CL_{50} e CL_{90} com maior precisão, a atividade moluscicida da piplartina foi avaliada em caramujos adultos e embriões em concentrações que variaram de 0,2 a 10 ppm, com intervalos de 0,2 ppm. Quando avaliada a 10 e 8 ppm, a piplartina causou 100% de mortalidade dos caramujos adultos durante o período de exposição (24 horas). Nas concentrações de 7,8 a 1,0 ppm as taxas de mortalidades foram inferiores a 100% e as mortes ocorreram durante os 7 dias de observação (Tabela 5, Figura 33).

Figura 33 - Mortalidade de *B. glabrata* adultos expostos a piplartina. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo log-log).



Fonte: Rapado (2012).

Embriões nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora e véliger de *B. glabrata* foram expostos à piplartina que, assim como a hidroquinona, induziu respostas diferentes de acordo com o desenvolvimento embrionário. Em embriões no estágio de blástula 100% de mortalidade foi obtida na concentração de 1,2 ppm (Figura 34), em gástrula a 2,2 ppm, trocófora a 3,6 ppm e véliger a 5 ppm. Assim, os valores das CL_{50} e CL_{90} foram distintos para cada estágio (Tabela 6, Figuras 35-38).

Tabela 6 - Valores das concentrações letais a 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) da população de *B. glabrata* adultos e embriões expostos a piplartina.

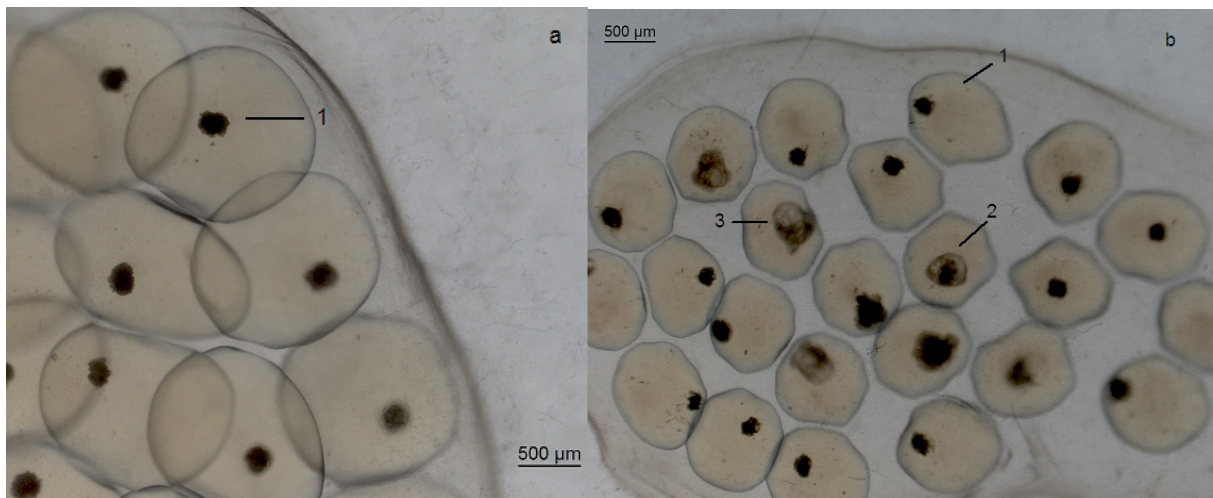
	Adultos	Estádios embrionários			
		Blástula	Gástrula	Trocófora	Véliger
CL₅₀ (ppm)	4,19 [4,01-4,37]	0,64 [0,60-0,68]	1,75 [1,67-1,84]	2,83 [2,77-2,89]	3,73 [3,66-3,79]
CL₉₀ (ppm)	6,94 [6,83-7,05]	0,99 [0,93-1,06]	2,50 [2,40-2,63]	3,33 [3,26-3,43]	4,35 [4,26-4,49]

[] intervalo de confiança de 95%

Valores obtidos ao final do 7º dia de observação

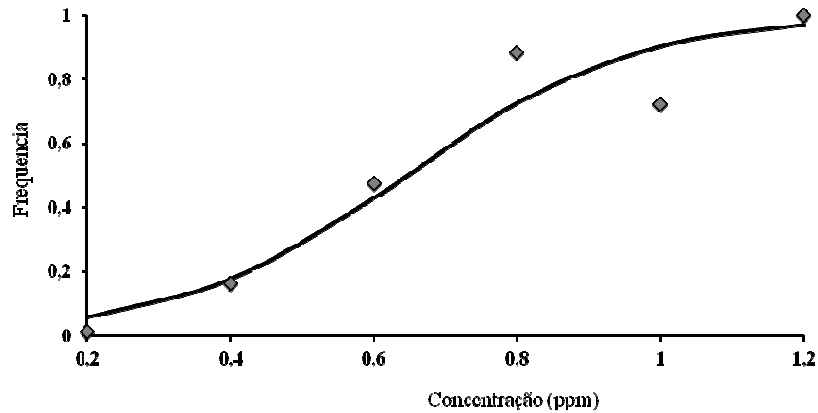
Fonte: Rapado (2012).

Figura 34 - Embriões de *B. glabrata* em estágio de blástula exposto a piplartina 1- mortos, 2- vivo e 3- malformado; a) na concentração de 1,2 ppm que causou 100% de mortalidade e b) na concentração de 1 ppm que causou 51,19% de mortalidade.



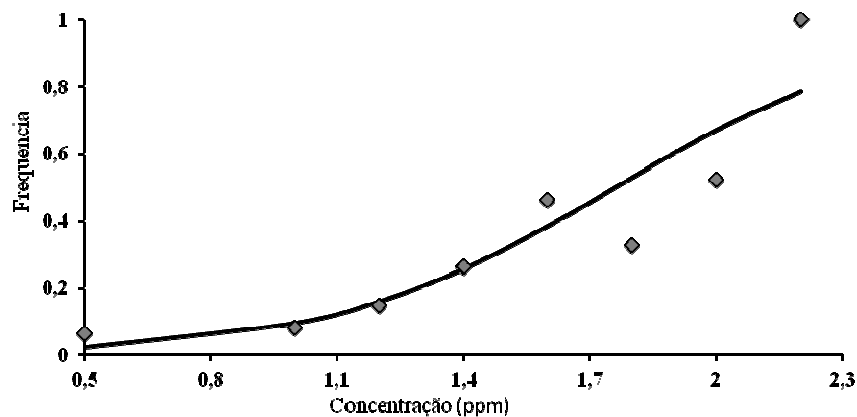
Fonte: Rapado (2012).

Figura 35 - Mortalidade de embriões em estágio de blástula obtida pela exposição a pirlartina. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo log-log).



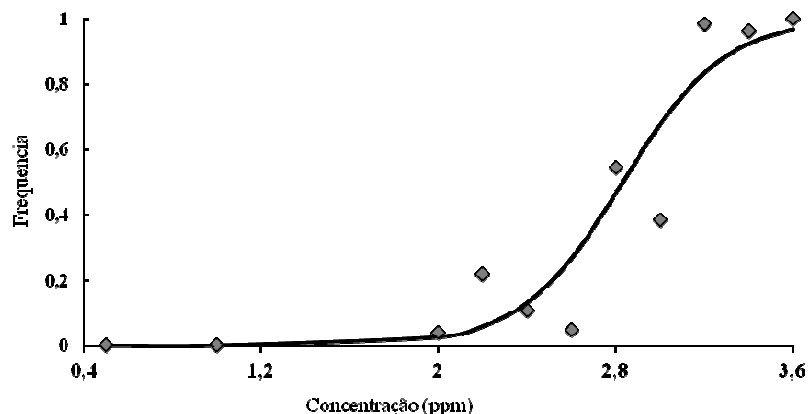
Fonte: Rapado (2012).

Figura 36 - Mortalidade de embriões em estágio de gástrula obtida pela exposição a pirlartina. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo log-log).



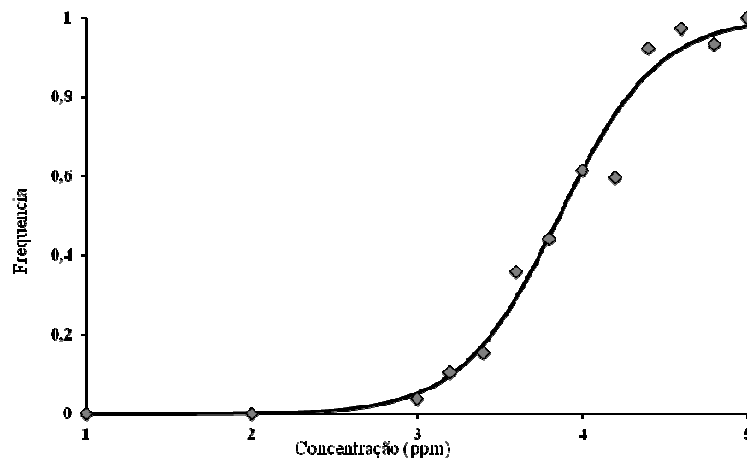
Fonte: Rapado (2012).

Figura 37 - Mortalidade de embriões em estágio de trocófora obtida pela exposição a pirlartina. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo log-log).



Fonte: Rapado (2012).

Figura 38 - Mortalidade de embriões em estágio de véliger obtida pela exposição a piplartina. Curva sigmóide de dados preditos por função logística (modelo log-log).



Fonte: Rapado (2012).

A piplartina foi aproximadamente sete vezes mais ativa em embriões que em adultos (CL_{90} 0,99 ppm e 6,94 ppm respectivamente), sendo que os estádios de blástula foram os mais sensíveis seguidos de gástrula, trocófora e véliger. Embriões expostos a concentrações inferiores às 100% letais apresentaram malformações que ocorreram frequentemente nos estádios iniciais de blástula e gástrula e resultaram na morte dos embriões.

4.2.2 Análise quimiométrica de Componente Principal (PCA) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Visando compreender a relação a atividade moluscicida da piplartina e dos extratos metanólicos de *P. tuberculatum* (espécie que originou a piplartina) foram realizadas as Análises de Componente Principal (PCA) e de Mínimos Quadrados Parciais (PLS), que relacionaram a atividade moluscicida dos extratos de raízes, caules, frutos e folhas de *P. tuberculatum* (Tabela 7) e os seus dados de espectro de massa com ionização por electrospray e regiões integradas de ^1H RMN.

Tabela 7 - Número de caramujos *B. glabrata* adultos mortos após exposição a extratos metanólicos de raiz, caule, folhas e frutos de *P. tuberculatum* e respectivos valores de concentrações letais (CL₅₀).

Parte de <i>P. tuberculatum</i>	Concentração (ppm)								CL ₅₀ (ppm)
	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
Raíz	30	30	30	30	30	16	8	2	20,28 [16,65-24,69]
Caule	30	24	9	5	4	1	2	0	200,00 [161,37-247,87]
Folha	30	21	4	3	1	3	2	2	310,27 [258,87-371,89]
Fruto	30	24	18	15	7	1	3	2	126,27 [97,08-164,25]

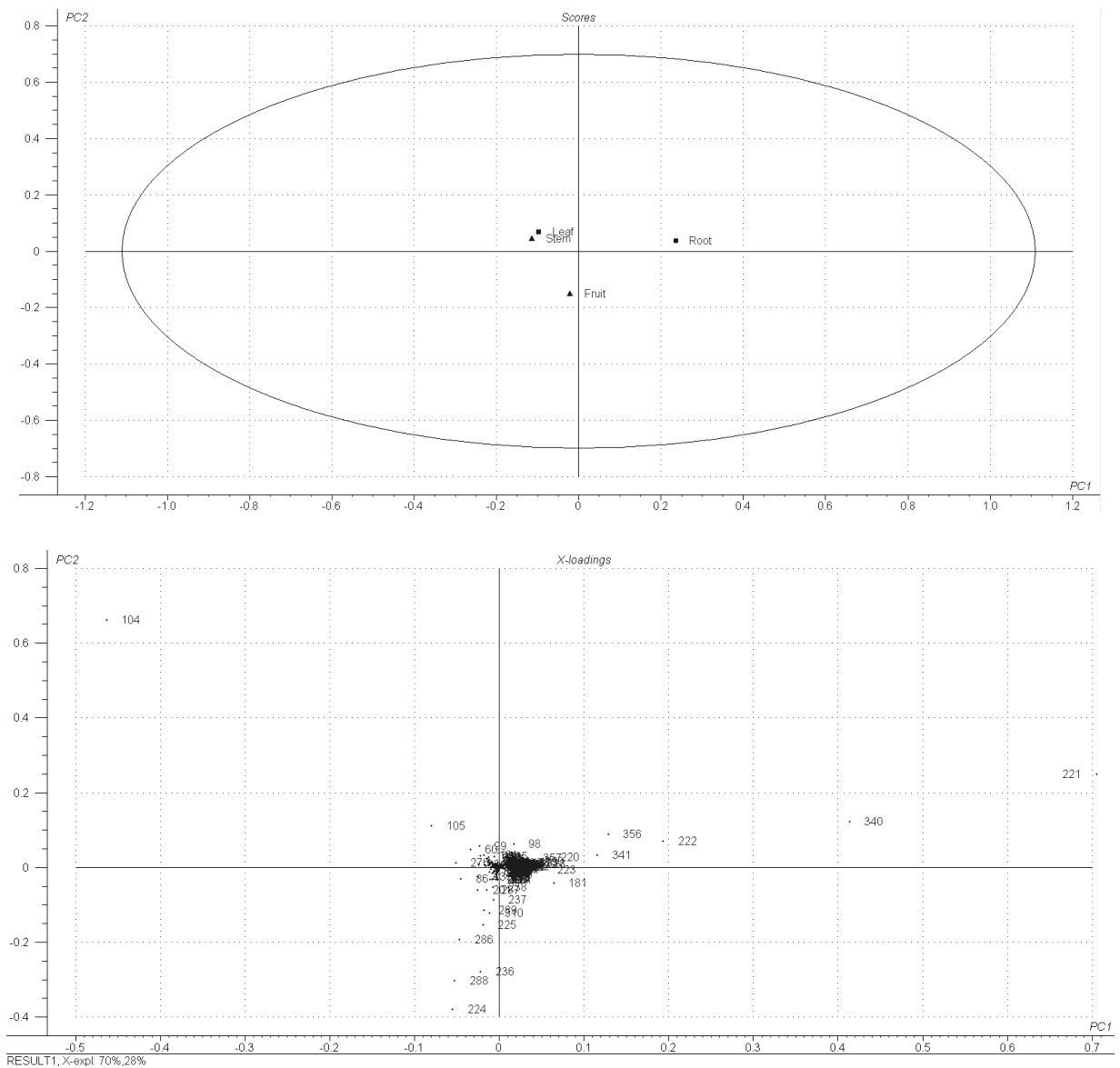
n=30 caramujos por concentração

[] intervalo de confiança de 95%

Fonte: Rapado (2012).

Uma análise preliminar utilizando PCA foi realizada considerando 601 variáveis independentes (abundância de íons de espectros de massa) e 200 variáveis (regiões integradas de ¹H RMN), claramente separadas dos extratos de raiz, caule, folhas e frutos de *P. tuberculatum*. Os pontos gerados a partir dos dados de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) (Figura 39) indicaram uma diferença dos extratos das raízes em relação aos das folhas e caules, agrupados no lado esquerdo da primeira componente principal (PC1), que explica 70% da variação total. Os dados indicam que os íons a 221, 222, 340, 341 e 356 m/z têm maior contribuição para essa componente (Figura 39). Adicionalmente, verificou-se que a segunda componente principal (PC2) explica 28% da variância total e juntamente com os dados plotados é possível afirmar que os íons a 224, 225, 236, 286, 288 m/z são responsáveis por diferenciar os frutos das outras partes de *P. tuberculatum*.

Figura 39 – Gráficos de scores e loadings de PCA gerados a partir de dados obtidos por ESI-MS dos extratos de raiz, caule, folha e fruto de *P. tuberculatum*.

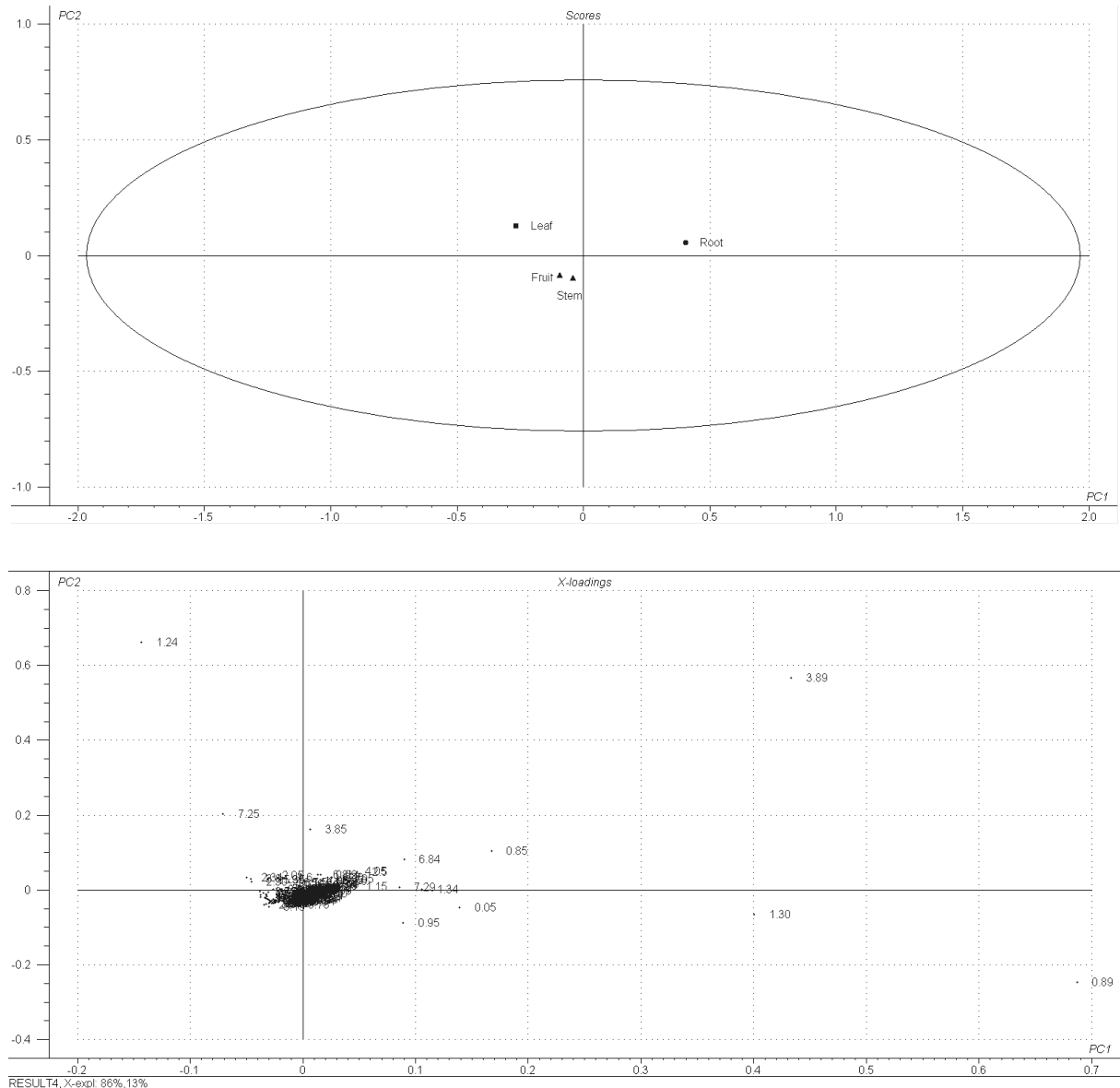


Fonte: Scotti (2012).

Os scores and loadings plots de PCA gerados a partir de valores dos sinais de espectros integrados em regiões de RMN ^1H (Figura 40), revelaram que 86% da variância total é explicada por PC1, que discrimina o extrato da raiz como o mais ativo em *B. glabrata*, indicado no lado direito do score plot, em relação aos extratos de frutos e caules agrupados no centro e o extrato das folhas (menos ativo) no lado esquerdo. Os dois primeiros PCs explicam quase 100% da variância total dos dados e os valores de regiões integradas 0,05, 0,85, 0,89,

1,30 e 3,89 têm contribuição positiva e significativa para PC1 e conseqüentemente valores mais elevados para o extrato de raiz.

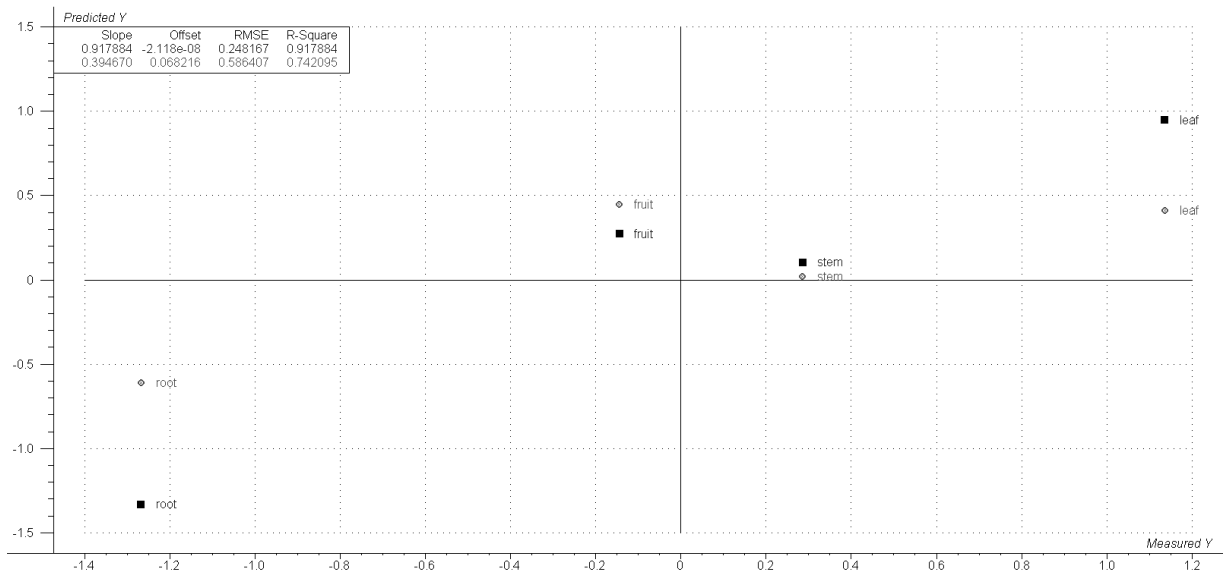
Figura 40 - Gráficos de scores e loadings de PCA gerados a partir de dados obtidos por ESI-MS dos extratos de raiz, caule, folha e fruto de *P. tuberculatum*.



Fonte: Scotti (2012).

A análise de PLS gerou valores significativos de 0,92 e 0,74 do coeficiente de determinação e de predição interna, visualizados no gráfico de valores medidos e preditos de CL_{50} (Figura 41).

Figura 41 – Valores calculados (pontos quadrados) e preditos (pontos redondos) das CL₅₀ obtidas dos extratos de raiz, caule, folha e fruto de *P. tuberculatum* em *B. glabrata*.

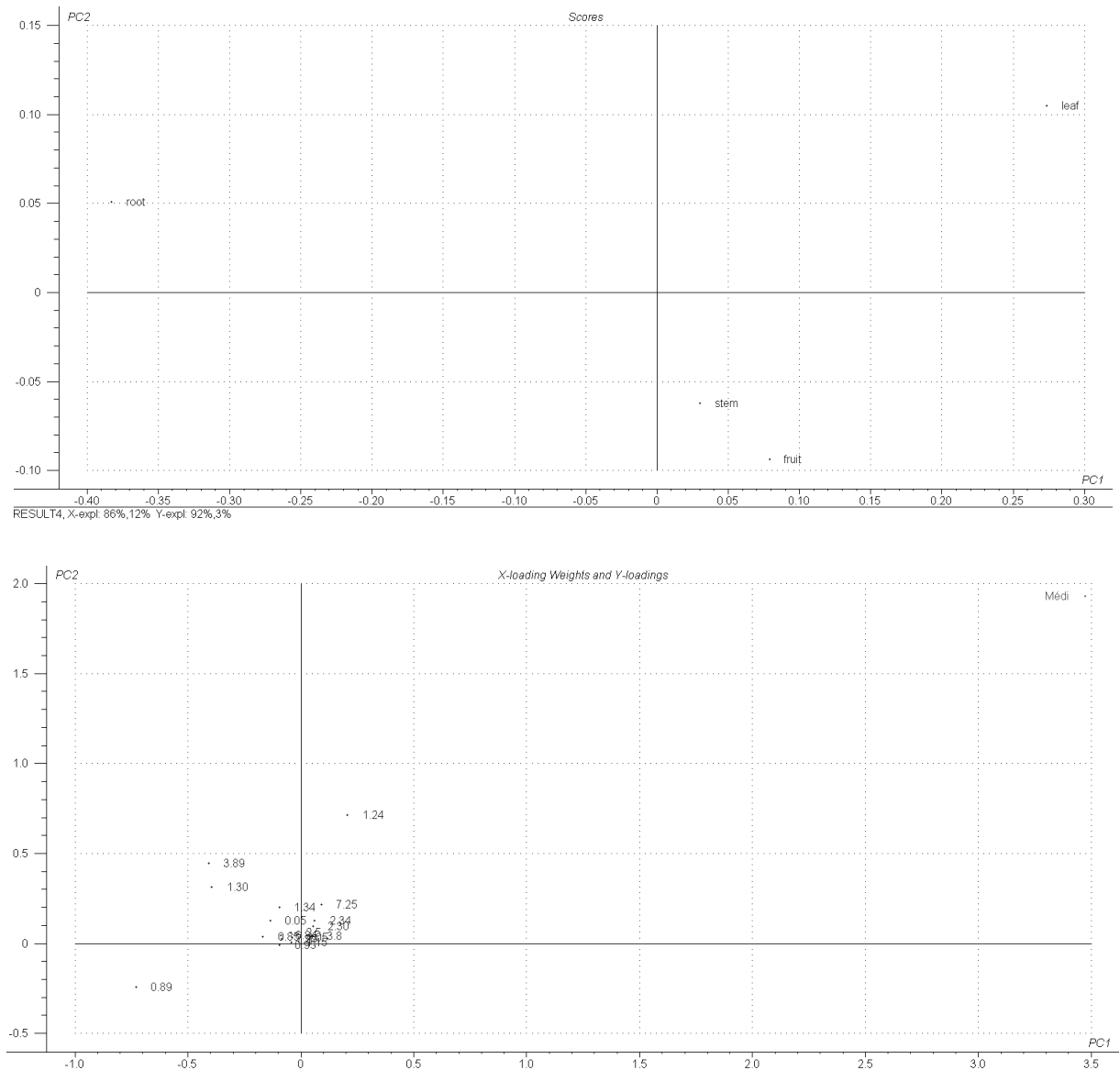


Fonte: Scotti (2012).

Os valores das regiões integradas 0,05, 0,85, 0,89, 1,30 e 3,89 são negativamente correlacionadas com os valores de CL₅₀, indicando que o extrato da raiz, com altos valores nas regiões integradas dessas áreas, é o mais ativo (Figura 42).

As análises de PCA e PLS indicaram que o extrato da raiz é o mais ativo em *B. glabrata*. Os dados de RMN mostraram que 92% da raiz é composta de piplartina, amida com íon molecular de 340, indicado na Figura 39 como um dos íons responsáveis pela atividade moluscicida de *P. tuberculatum*.

Figura 42 - Scores e weights plot gerados pela análise de PLS usando o autoescalonamento dos valores de CL₅₀ dos extratos de *P. tuberculatum* em *B. glabrata* e valores dos sinais das regiões integradas de 1H RMN obtidos dos extratos de *P. tuberculatum*.



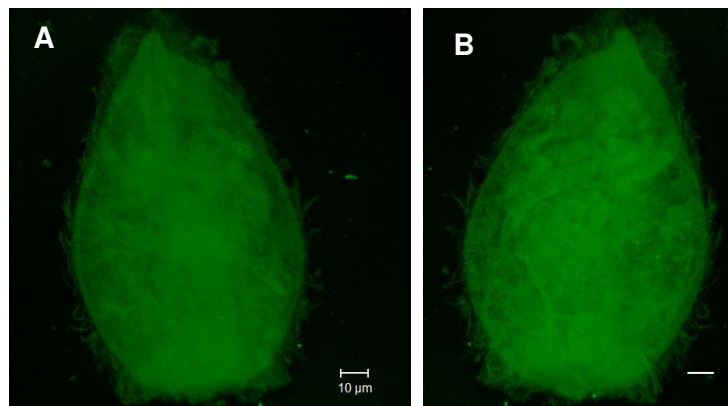
Fonte: Scotti (2012).

4.2.3 Avaliação da atividade esquistossomicida da piplartina

Miracídios de *S. mansoni* foram expostos à piplartina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 e 20 ppm. Não houve morte em nenhuma concentração; contudo, os miracídios expostos a 8, 10 e 20 ppm, durante os 5 minutos iniciais de exposição alteraram o padrão de locomoção e ficaram imóveis, porém após 15 minutos de exposição, os miracídios recuperaram movimentação normal. No final dos 120 minutos de exposição, os miracídios em todas as

concentrações permaneceram vivos e com movimentos semelhantes ao grupo controle (DMSO 1%). Os miracídios expostos a 10 e 20 ppm foram analisados em microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss) e apresentaram estruturas e morfologia externa preservadas (Figura 43).

Figura 43 - Miracídios de *S. mansoni* A- expostos a pipartina na concentração de 20 ppm e B- pertencente a grupo controle. Imagens obtidas em microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss).

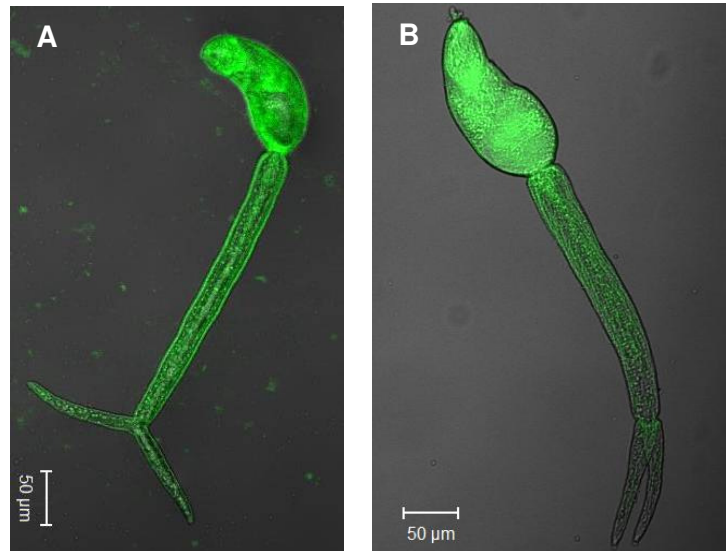


Fonte: Rapado (2012).

As cercárias de *S. mansoni* foram expostas a pipartina em concentrações que variaram de 2 a 20 ppm (intervalos de 2 ppm). Assim como os miracídios, as cercárias apresentaram padrão de movimentação alterado. Notou-se nos primeiros 5 minutos de exposição, em todas as concentrações, uma paralisia temporária das cercárias. A movimentação normal foi recuperada em 15 minutos de exposição nas concentrações inferiores a 8 ppm e em 30 minutos nas concentrações superiores a 10 ppm, exceto a de 20 ppm. Ao final dos 120 minutos de exposição a 20 ppm de pipartina, aproximadamente 50% das cercárias ficaram imóveis no fundo da placa, indicando média toxicidade. Estas cercárias foram analisadas em microscópio confocal e não apresentaram alterações morfológicas (Figura 44).

A niclosamida foi utilizada como controle positivo para miracídios e cercárias. Os miracídios e cercárias apresentaram 100% letalidade na concentração de 0,3 ppm e 0,1 ppm respectivamente, assim como descrito por Andrews, Thyssen e Lorket (1983).

Figura 44 - Cercárias de *S. mansoni* A- expostas a piplartina na concentração de 20 ppm e B- pertencente a grupo controle. Imagens obtidas em microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss).



Fonte: Rapado (2012).

4.2.4 Avaliação da toxicidade da piplartina

A toxicidade aguda da piplartina para *D. similis* e *D. rerio* está apresentada nas Tabelas 8 e 9. A piplartina foi aproximadamente 5 vezes mais tóxica para *D. rerio* que para *D. similis* (Tabela 9). Em *D. rerio*, além de mortes foram observadas, nas concentrações subletais, alterações no comportamento e na morfologia dos peixes como: natação irregular (abdome para cima), pontos avermelhados no corpo, hemorragia, deformação principalmente na região da cabeça, abdome dilatado e olhos salientes (Figura 45). Essas alterações, ocorridas durante as 48 horas de exposição, não causaram a morte dos animais.

A piplartina foi classificada como tóxica para organismos aquáticos, já a niclosamida, classificada como muito tóxica (ABIQUIM, 2005). Não houve diferença de toxicidade durante as 24 e 48 horas de exposição para os dois compostos.

Tabela 8 - Mortalidade de *Daphnia similis* e *Danio rerio* expostos a piplartina e niclosamida.

Espécie	Composto/concentração (ppm)	Mortalidade (%)
<i>Daphnia similis</i>	Piplartina	
	0*	0
	2	2 (10)
	4	1 (5)
	6	9 (45)
	8	13 (65)
	10	20 (100)
	Niclosamida	
	0 ¹	0
	0,01	4 (20)
	0,02	10 (50)
	0,03	12 (60)
	0,06	15 (75)
	0,12	17 (85)
0,25	20 (100)	
<i>Danio rerio</i>	Piplartina	
	0*	0
	1	0
	1,2	0
	1,4	0
	1,6	3 (30)
	1,8	7 (70)
	2	10 (100)
	Niclosamida	
	0 ¹	0
	0,1	0
	0,2	10 (100)
	0,3	10 (100)
	0,4	10 (100)
0,5	10 (100)	

n= 20 *Daphnia similis* e 10 *Danio rerio* por concentração

*0= controle negativo - DMSO 1%

¹ 0= controle negativo - água

Fonte: Rapado (2012).

Tabela 9 - Toxicidade dos compostos piplartina e niclosamida para microcrustáceo aquático *Daphnia similis* e peixe *Danio rerio*.

Espécie	Composto	Concentrações efetiva CE ₅₀ e letal CL ₅₀ (ppm)	Classificação tóxica
<i>Daphnia similis</i>	Piplartina	CE ₅₀ 7,32 [6,93-7,69]	T
	Niclosamida	CE ₅₀ 0,02 [0,02-0,03]	MT
<i>Danio rerio</i>	Piplartina	CL ₅₀ 1,69 [1,61-1,77]	T
	Niclosamida	CL ₅₀ 0,12 [0,1-0,19]	MT

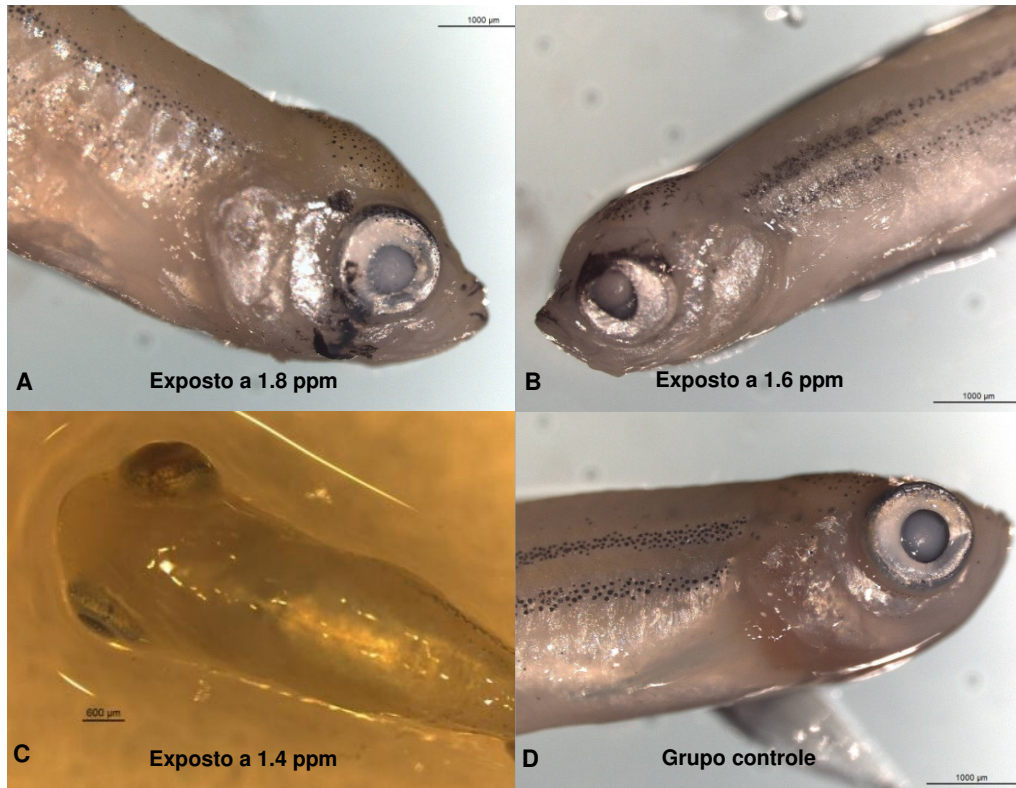
n= 20 *Daphnia similis* e 10 *Danio rerio* por concentração

[] intervalo de confiança de 95%

Classificação toxicológica: MT = muito tóxico (tox.aguda ≤ 1 mg/L); T = tóxico (1mg/L < tox.aguda ≤ 10 mg/L); LT = levemente tóxico (10 mg/L < tox.aguda ≤ 100 mg/L) e NT = não tóxica (tox.aguda > 100 mg/L).

Fonte: Rapado (2012).

Figura 45 - Alterações morfológicas em *D. rerio* causadas por 48 horas de exposição a piplartina, A-extravazamento do pigmento ocular, B- deformação dos tecidos da boca e cabeça, C- olho saliente com hemorragia e D- animal do grupo controle.



Fonte: Rapado (2012).

5 DISCUSSÃO

A busca de compostos de origem vegetal ativos no hospedeiro *Biomphalaria* como uma possível alternativa para o controle da esquistossomose em locais endêmicos tem sido na última década realizada por diversos países e grupos de pesquisas (BAGALWA et al., 2010; BALOCH; BALOCH; BALOCH, 2009; BORKOSKY et al., 2009; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; PEREIRA et al. 2011; RIBEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2007; SINGH; YADAV; SINGH, 2010). Nesse contexto, o Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan em colaboração com o Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP iniciou em 1996 a bioprospecção de espécies vegetais da família Piperaceae com atividade moluscicida em *B. glabrata*. Foram descritas algumas espécies ativas, sendo cinco as mais promissoras *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper cuyabanum*, *Piper diospyrifolium* e *Piper hostmanninaum* (RAPADO et al., 2010). Neste trabalho, os estudos de bioprospecção em Piperaceae prosseguiram com o objetivo de identificação e isolamento dos compostos moluscicidas presentes em espécie ativa anteriormente descrita.

Apesar de Rapado et al. (2010) terem descrito a atividade das cinco espécies acima citadas, novas coletas e extratos brutos foram elaborados para a confirmação da atividade moluscicida, uma vez que a constituição química dos metabólitos secundários de um vegetal pode ser modificada devido a variações climáticas, sazonalidade e ação de predadores, alterando a atividade biológica descrita a um extrato bruto (SANTOS, 2007). Das cinco espécies apenas *P. aduncum* não reproduziu a atividade moluscicida descrita anteriormente. O extrato metanólico de folhas de *P. aduncum* elaborado neste estudo na concentração de 10 ppm matou apenas 10% dos caramujos, diferente do resultado obtido no estudo anterior (CL₉₀ 6,46 ppm – Quadro 5). O local da coleta de *P. aduncum* realizada por Rapado et al. (2010) difere da região de coleta deste estudo, o que possibilitaria uma variação no perfil dos metabólitos secundários. Almeida et al. (2009) descreveram uma variação química no óleo essencial de *P. aduncum* coletado na Amazonia e norte do Brasil, cujo óleo essencial possui majoritariamente dilapiol, em relação a *P. aduncum* coletada na Mata Atlântica, nordeste e sudoeste do Brasil, onde predominam terpenos e linalol. Apesar das regiões de coleta de *P. aduncum* terem sido distintas, não há como atribuir a ausência de atividade moluscicida apenas a esse fator, uma vez que no estudo de Rapado et al. (2010) não há a descrição do perfil fitoquímico do extrato avaliado.

A escolha do fracionamento biomonitorado para o estudo da atividade moluscicida da espécie *P. diospyrifolium* se baseou, principalmente, na ausência de informações sobre sua composição química, o que impede o direcionamento da busca de compostos para uma classe química específica. Dessa forma, o fracionamento biomonitorado foi a melhor técnica para a

obtenção de compostos ativos e possibilitou a descoberta de um composto inédito, o ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico e o conhecimento da atividade moluscicida da flavocavaína A. Por outro lado, esses resultados direcionaram os estudos de busca de compostos para o grupo das chalconas e dos ácidos benzoicos.

A flavocavaína A já havia sido identificada e isolada em *Piper methysticum* e descritas a atividade bactericida (em *Salmonella t.vphii*) e seus potenciais antimitótico, antitumoral e na redução da inflamação pela inibição do fator nuclear kappa B (NF-KB) (FORLMER et al., 2006; PARMAR et al., 1997; ZI; SIMONEAU, 2005). As flavocavaínas A, B e C, assim como compostos do grupo das chalconas, possuem diversas atividades biológicas descritas (Quadro 3). Contudo, apenas o estudo realizado por Adewunmi; Ogungbamila e Oluwadiya (1986) descreve a atividade moluscicida de chalconas, a 2,4-dihidroxi-3',6'-dimetoxichalcona, isolada de *Polygonum senegalense* Meisn. (Polygonaceae) (100% ativa em *B. glabrata* na concentração de 10 ppm) e de mais cinco chalconas sintéticas. Os autores avaliaram a atividade de 24 chalconas sintéticas e descreveram a possibilidade da atividade moluscicida estar associada a um equilíbrio hidrófilo-lipofílico na molécula.

Neste estudo três chalconas foram avaliadas: 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona (CL₉₀ 6,47 ppm), flavocavaína A (CL₉₀ 27,97 ppm) e dihidroflavocavaína C (não ativo) e apesar da atividade moluscicida diferenciada dos três compostos, não foi possível relacionar a atividade moluscicida com o equilíbrio hidrófilo-lipofílico da molécula proposto por Adewunmi, Ogungbamila e Oluwadiya (1986) devido ao reduzido número de chalconas avaliadas.

Além do ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico isolado de *P. diospyrifolium* neste estudo, outro ácido benzoico prenilado, o ácido caldensínico (Quadro 3), isolado de *Piper caldense* C.DC., também foi ativo em *B. glabrata* e recentemente descrito pelo grupo de pesquisa na qual este estudo está inserido (FREITAS et al., 2009; TAKAHASHI, 2011). Ambos os compostos possuem atividade em baixas concentrações (ácido 4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil] benzoico - CL₉₀ 10,04 ppm e ácido caldensínico CL₉₀ 13,62 ppm), por isso foi solicitado o pedido de patente intitulada “Extração e uso de ácido caldensínico e seus análogos como moluscicida e esquistossomicida”, na qual o ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico isolado neste estudo é integrante.

Ambos os compostos 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico e ácido caldensínico possuem atividade moluscicida em baixas concentrações e o grupo funcional *orto*-hidroxibenzoil em comum. Visando uma possível compreensão inicial da relação estrutura-atividade em ácidos benzoicos, a hidroquinona e o ácido para-

hidroxibenzóico foram avaliados em *B. glabrata*, e até o momento, pode-se inferir a importância dos grupos funcionais carboxil e prenil para atividade moluscicida. Os estudos com esse grupo químico prosseguirão e outros ácidos benzoicos de *Piper* estão sendo isolados e serão avaliados em estudos posteriores fornecendo informações sobre a relação estrutura-atividade e determinação dos grupos funcionais essenciais para a atividade moluscicida de ácidos benzoicos.

Neste estudo, avaliou-se a atividade moluscicida de 8 compostos, sendo 3 chalconas (2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona, flavocavaína A, dihidroflavocavaína C), 1 ácido benzoico (4-hidroxi-3-[3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil] benzoico) e 4 amidas (pelitorina, piperina, piperlonguminina e piplartina). Quatro compostos de grupos químicos distintos, a 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona, flavocavaína A, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico e piplartina foram ativos em *B. glabrata* adultos em concentrações recomendadas pela OMS para um moluscicida de origem vegetal.

O mecanismo de ação dos moluscicidas ainda não é estabelecido; a niclosamida, utilizada desde a década de 80, não possui seus mecanismos de ação elucidados, contudo, acredita-se a morte de caramujos expostos a compostos químicos ocorra possivelmente devido a alterações em mais de um sistema fisiológico como redução de batimentos cardíacos e inchaço de tecidos devido a alteração do balanço hídrico celular (DUNCAN, 1985; WHO, 1983).

Os compostos flavocavaína A e ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico apesar de ativos em adultos não causaram a morte de embriões de *B. glabrata*. A ausência de mortes em embriões exposto a compostos químicos letais para adultos também foi descrita em outros estudos (KAWANO; SIMÕES, 1986; LEMMA et al., 1972; LEYTON et al., 2005; MIYASATO et al., 2012; RAPADO et al., 2010; RÉ; KAWANO, 1987; SCHALL et al., 1998). Uma possível explicação para a diferença de sensibilidade entre adultos e embriões de *B. glabrata* expostos a compostos consiste no fato dos embriões desenvolverem-se no interior das desovas e por isso, serem envoltos por duas membranas e uma massa gelatinosa, que podem em alguns casos atuar como barreiras alterando ou impedindo a penetração de compostos. Segundo Hathaway et al. (2010) as desovas de *B. glabrata* são cobertas por fluido perivitelínico sintetizado e secretado pela glândula de albúmen e encapsuladas por uma membrana produzida pela *pars contorta*. As desovas encapsuladas são envolvidas por secreções produzidas por glândulas mucíparas e da ooteca para formar a massa dos ovos que é oviposta pelo caramujo no ambiente aquático. De acordo com os autores, as proteínas que compõe a massa dos ovos possuem atividade

microbicida e protegem os embriões no interior das desovas da ação de bactérias, fungos e outros patógenos. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da desova e seus constituintes na proteção a exposição a compostos químicos.

Diferente do descrito acima, os compostos 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona, hidroquinona e piplartina, assim como a niclosamida (ANDREWS; THYSSEN; LORKET, 1983) possivelmente penetram as membranas e a massa gelatinosa que envolvem os embriões e causam sua morte. A 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona foi o único composto mais ativo em adultos (CL₉₀ 6,47 ppm) do que em embriões (CL₉₀ 13,54 a 14,87 ppm) e em concentrações inferiores as 100% letais (15 e 10 ppm – Tabela 3) causou um atraso no desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*. Segundo Kawano et al. (1992) os embriões eclodem cerca de 5 dias após a primeira clivagem embrionária, contudo 12 dias após a primeira clivagem os embriões expostos a 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona ainda permaneciam no interior da desova e possuíam batimentos cardíacos (Figura 29). A 2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona pode ter causado malformações (não analisadas nesse estudo) que impossibilitaram que os embriões rompessem as membranas da desova. Segundo Oliveira-Filho et al. (2010) o atraso na eclosão provocado pela exposição a um composto ocorre devido a malformações e comprometem o desenvolvimento do caramujo caso a eclosão ocorra.

A hidroquinona e a piplartina apresentaram uma diferença de atividade entre os estágios de desenvolvimento de *B. glabrata* sendo a sensibilidade inversamente proporcional à fase do desenvolvimento (Tabelas 3 e 5). A diferença de atividade entre os estágios de desenvolvimento de *B. glabrata* expostos a compostos químicos também foi descrita em outros estudos (KAWANO; SIMÕES, 1987; MIYASATO et al., 2011; RAPADO et al., 2010; YAMAMOTO, 1996).

A piplartina não causou inibição do desenvolvimento embrionário apenas em *B. glabrata* (100% de inibição dos embriões em estágio de blástula na concentração de 1,2 ppm), mas também em embriões de ouriço do mar, em primeira e terceira clivagem e blástula, expostos a concentrações inferiores a 7 ppm dessa amida. Em embriões de ouriço a inibição do desenvolvimento foi relacionada a uma atividade antimitótica e atribuída a mecanismos de ação específicos, porém não determinados (BEZERRA et al., 2005).

De todos os compostos avaliados nesse estudo a amida piplartina foi a mais ativa em *B. glabrata* adultos (CL₉₀ 6,94 ppm) e embriões (CL₉₀ 0,99 a 4,35 ppm) e por isso, suas atividades esquistosomicida e toxicidade foram estudadas.

A piplartina não apresentou atividade esquistosomicida nas fases livre nadantes do *S. mansoni* (miracídios e cercárias). Miracídios expostos a 20 ppm de piplartina inicialmente

apresentaram alteração no padrão de mobilidade, que foi rapidamente reestabelecido sem afetar a sobrevivência. As cercárias nessa mesma concentração também apresentaram alteração na mobilidade que resultou em 50% de mortalidade. Pode-se observar uma diferença de sensibilidade entre os estágios de miracídio e cercária, esquistossômulo e adultos de *S. mansoni* expostos à pipartina. Segundo Moraes (2011) os parasitas adultos são mais suscetíveis à pipartina em relação aos jovens, sendo a concentração de 3 ppm suficiente para causar 100% de mortalidade em machos e fêmeas de *S. mansoni* adultos. Já a concentração necessária para causar 100% de mortalidade em esquistossômulos é de 25 ppm. A diferença de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* não foi descrito apenas com relação à pipartina, mas também à epiisopiloturina, praziquantel, oxamniquine e artemeter onde houve uma diferença de sensibilidade entre os estágios de vida do *S. mansoni* (ARAGÓN et al., 2009; VERAS et al., 2012; UTZINGER et al., 2003). Diversos autores descreveram diferenças no metabolismo de lipídios e proteínas, entre outras moléculas, durante as fases do desenvolvimento do *S. mansoni*, mas nenhum estudo até o momento descreveu as causas dessa diferença de sensibilidade entre os estágios do parasito; contudo, segundo esses autores, as mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do parasita podem estar relacionadas à diferença de sensibilidade (KUSEL; GORDON, 1989; SKELLY; ALAN WILSON, 2006).

A toxicidade da pipartina foi avaliada em *D. similis* e *D. rerio* e para ambos os organismos foi classificada como tóxica (Tabela 9). Já estudos com *Artemia salina* classificaram a pipartina como levemente tóxica (CL_{50} $32,3 \pm 3,4$ $\mu\text{g/ml}$) (BEZERRA et al., 2005). Apesar de classificada como tóxica neste estudo, a pipartina foi menos tóxica que a niclosamida, utilizada como moluscicida para controlar a transmissão da esquistossomose em locais endêmicos e muito tóxica segundo os mesmos critérios (ANDREWS; THYSSEN; LORKET, 1983; WHO 1993).

Apesar da atividade em diversos modelos biológicos, como visto no Quadro 4, os mecanismos de ação da pipartina não foram elucidados. Ainda não há estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade moluscicida em amidas, apenas é sabido que a atividade moluscicida da niclosamida é atribuída ao grupo nitro, presente em sua molécula (ABREU; GOULART; BRETT, 2002).

Nos nossos estudos mais recentes estão sendo desenvolvidos análogos da pipartina para auxiliar na definição dos constituintes químicos responsáveis pela atividade moluscicida e na indução de efeitos tóxicos dessa amida. Até o momento, 20 análogos sintéticos da pipartina foram avaliados e nenhum exibiu atividade comparável à da pipartina 100% ativa

na concentração de 10 ppm (APÊNDICE D). O desenvolvimento de análogos está sendo realizado de acordo com o método de QSAR (relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica). Ainda 25 amidas com diferentes variações estruturais foram sintetizadas e avaliadas em *B. glabrata* (APÊNDICE C). Acredita-se que os estudos com análogos possibilite uma melhor compreensão da região responsável pela atividade moluscicida e da toxicidade da piplartina.

A busca de compostos moluscicidas em *Piper* foi realizada por meio do fracionamento biomonitorado em *P. diospyrifolium*, espécie cujo extrato bruto foi descrito como ativo e em compostos isolados do grupo das amidas e chalconas. Segundo Hostettmann e Marston (1997) o monitoramento da atividade biológica das frações obtidas é indicado por possibilitar o direcionamento das operações de fracionamento para o isolamento dos compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos. Neste estudo, o fracionamento monitorado da atividade biológica e das frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas e também por ressonância magnética nuclear foi adequado e não só possibilitou a identificação e isolamento de compostos ativos, sendo um de estrutura inédita, como também direcionou a busca de compostos para o grupo das chalconas. O biomonitoramento tem sido empregado na obtenção de compostos com atividade fungicida, bactericida, tripanocida, leishmanicida, antioxidante e anti-inflamatória (AMARANTE et al., 2011; BACKHOUSE et al., 2008; D'ALMEIDA et al., 2012; DHOOGHE et al., 2010; FRATERNALE et al., 2011; ODONNE et al., 2011; PEREIRA et al., 2010; REIGADA, 2009; TEMPONE et al., 2008); no entanto até o momento, essa metodologia não havia sido realizada para a obtenção de compostos com atividade moluscicida.

A análise quimiométrica foi realizada neste estudo visando compreender a relação entre a ausência de atividade moluscicida descrita por Rapado et al. (2010) do extrato de folhas de *P. tuberculatum* e a promissora atividade moluscicida da piplartina, uma vez que essa amida foi isolada das folhas de *P. tuberculatum*. É importante ressaltar que nesse estudo foram utilizadas apenas 4 amostras de extratos, que contudo não comprometeram as análises, uma vez que os estudos de PLS corroboraram os resultados obtidos por PCA (Figura 41).

Os dados de espectrometria de massas (ESI-MS) e de ressonância magnética nuclear (^1H RMN) dos extratos de raiz, caule, folha e fruto de *P. tuberculatum* associados aos dados de atividade moluscicida em *B. glabrata* (CL_{50}) de cada extrato, por análise de componente principal (PCA), possibilitou a identificação da raiz como a parte da planta mais ativa e atribuiu esse resultado à presença de piplartina, uma vez que 98% do extrato da raiz é

composto por essa amida. Os resultados obtidos por quimiometria corroboram a atividade moluscicida da piplartina e relacionam o extrato da raiz de *P. tuberculatum*, região onde a piplartina é majoritária com a atividade em *B. glabrata*. Esse resultado explica a ausência de atividade moluscicida descrita por Rapado et al. (2010) ao extrato de folhas de *P. tuberculatum*.

A Análise de Componente Principal não foi empregada neste estudo com a finalidade de identificar um composto ativo; contudo, esse método foi eficaz na identificação de um composto ativo a partir de um extrato bruto, indicando ser uma ferramenta viável não apenas em estudos de metabolômica e de perfil metabólico de espécies vegetais mas também em estudos de busca de compostos ativos.

Neste estudo, a obtenção de compostos moluscicida foi realizada por meio do fracionamento biomonitorado em *B. glabrata* de *P. diospyrifolium* e em compostos isolados do grupo das amidas e chalconas. Ambas as metodologias mostraram-se eficazes, uma vez que o fracionamento biomonitorado de *P. diospyrifolium* possibilitou o isolamento de dois compostos moluscicidas e a avaliação de compostos do grupo das amidas identificou o composto mais ativo deste estudo, a piplartina.

Além do fracionamento biomonitorado e da avaliação de compostos de grupos químicos promissores, o estudo de PCA mostrou ser uma ferramenta viável para a obtenção de compostos moluscicida em espécies com perfil químico descrito. Este trabalho foi o primeiro a realizar o fracionamento biomonitorado e utilizar a quimiometria para a busca de compostos com atividade moluscicida.

6 CONCLUSÕES

1. As espécies de *Piper* são promissoras para estudos de busca de compostos com atividade moluscicida;
2. a amida piplartina foi o composto mais promissor deste estudo, por ser de fácil isolamento, apresentar atividade moluscicida em baixas concentrações quando comparado aos outros compostos descritos na literatura e causar a morte de embriões em concentrações menores que as letais para os adultos de *B. glabrata*. A piplartina foi tóxica para *D. similis* e *D. rerio*, todavia modificações estruturais estão sendo realizadas a fim de diminuir a toxicidade e melhorar a atividade moluscicida e esquistossomicida;
3. o fracionamento biomonitorado da atividade moluscicida em *P. disopyrifolium* resultou no isolamento de dois compostos ativos: o ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico de estrutura química inédita e a flavocavaína A, descrita e isolada pela primeira vez em *P. diospyrifolium*;
4. o fracionamento biomonitorado e a avaliação de compostos isolados mostraram-se eficazes, uma vez que o fracionamento biomonitorado de *P. diospytifolium* possibilitou o isolamento de dois compostos moluscicidas e a avaliação de compostos do grupo das amidas identificou o composto mais ativo deste estudo, a piplartina;
5. o estudo de PCA mostrou ser uma ferramenta viável para a obtenção de compostos moluscicida em espécies com perfil químico descrito.

REFERÊNCIAS¹

- ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M. O. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 11-12, p. 913-919, 2002.
- ADEWUNMI, C. O.; OGUNGBAMILA, F. O.; OLUWADIYA, O. Molluscicidal activities of some synthetic chalcones. **Planta Medica**, p. 110-112, 1987.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.
- ALBIERO, A. L. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 2005.
- ALMEIDA, R. R. et al. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole – rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 9, p. 1427-1234, 2009.
- AMARAL, R. S. et al. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.79-85, 2006. Supl. 1.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANANTARAMAN, M. Biological control of aquatic snails. **Indian Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 65-67, 1955.
- ANDRADE, M. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: evaluation of (-)-cubebin derivatives activity in the messenger RNAs processing. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 445-451, 2011.
- ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 95, 1983.
- ARAGÓN, A. D. et al. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, p. 57-65, 2009.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Piperdardine, a piperdine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 559-561, 1997.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the country-region Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 207, 1933.

¹ *De acordo com:

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA QUÍMICA. **O que é o GHS?** Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos. São Paulo: Abiquim/Detec, 2005. 69 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** análise ecotoxicológica aquática: toxicidade de efluentes líquidos, águas superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas. São Paulo, 2004a. 26 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia* spp (Cadocera, Crustacea). São Paulo, 2004b. 21 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13343:** ecotoxicidade aquática: toxicidade crônica: método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005. 15 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088:** ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. São Paulo, 2006. 19 p.

BACKHOUSE, N. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 263-269, 2008.

BAGALWA, J. M. et al. Evaluation of the biological activity of the molluscicidal fraction of *Solanum sisymbriifolium* against non target organisms. **Fitoterapia**, v. 81, p. 767-771, 2010.

BAILEY, N. J. C. et al. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via ¹H RMN spectroscopy and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 62, p. 851-858, 2003.

BAKER, J. D. Tradition and toxicity: evidential cultures in the kava safety debate. **Social Studies of Science**, v. 41, n. 3, p. 361-384, 2011.

BALDOQUI, D. C. et al. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, 1999.

BALOCH, I. B.; BALOCH, M. K.; BALOCH, A. K. Bio-active compounds from *Euphorbia cornigera* Boiss. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3188-3194, 2009.

BAPTISTA, D. F. et al. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 25, n. 3, p. 419-424, 1994.

BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, 1991. v. 2, 321 p.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia**, v. 29, n. 4, p. 555-557, 2005.

BATISTA, J. et al. Natural chromens and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, n. 2, p. 339-343, 1999.

BERNARD, C. B. et al. Insecticidal defenses of piperaceae from neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 801-814, 1995.

BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P. et al. Pipartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2007.

BEZERRA, D. P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with pipartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BEZERRA, J. C. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 807-821, 1985.

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

BORKOSKY, S. et al. Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe Vernonieae (Compositae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 513-519, 2009.

BRAZ-FILHO, R. B.; SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. Pipartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 345-346, 1981.

CAMARA, C. A. et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-1,4 naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 80, n. 2, p. 329-334, 2008.

CAMEY, T.; VERDONK, N. H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 20, n. 1, p. 93-121, 1970.

CAMPOS, M. P. et al. Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. VAR. *solmsianum* (Piperaceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, n. 2-4, p. 173-178, 2007.

CAPRON, M. A.; WIEMER, D. F. Piplaroxide, an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 794-795, 1996.

CARVALHO, O. S. et al. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni**: esquistossomose uma visão multidisciplinar. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 394-418.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Advisory hepatic toxicity possibly associated with kava-containing products**: United States, Germany, and Switzerland, 1999–2002. Atlanta: American Medical Association, 2003. v. 289.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância epidemiológica e controle da esquistossomose**. São Paulo, 2008. 56 p.

CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. Amides from *P. tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 74, p. 131-138, 2003.

CHEN, Y. C. et al. A new aristolactam alkaloid and anti-platelet aggregation constituents from *Piper taiwanense*. **Planta Medica**, v. 70, n. 2, p. 174-177, 2004.

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

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Influência de agentes tóxicos no tratamento de esgotos por via biológica**: processo de lodo ativado. São Paulo: CETESB, 1986.

CORREA, E.; STERNER, O.; ECHEVERRI, F. Prenylhydroxybenzoic acid compounds with pungent activity from *Piper arieianum* (CDC) leaves. **Phytochemistry**, v. 72, p. 238-241, 2011.

COSTA, S. S.; MORS, W. Amides of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1305-1307, 1981.

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

COURA, J. R. Control of schistosomiasis in Brazil: Perspectives and proposals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 257-260, 1995.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 13-19, 2004. Supl. 1.

COURA-FILHO, P. et al. Identification of factors and groups at risk of infection with *Schistosoma mansoni*: a strategy for the implementation of control measures? **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 245-253, 1994.

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

DA SILVA, R. V. et al. Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 402-408, 2010.

D'ALMEIDA, R. E. et al. Antimicrobial phenylpropanoids from the argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**. 2012. In press.

DANELUTTE, A. P. et al. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 555-559, 2003.

DANELUTTE, A. P. et al. Divergency of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 16, p. 1425-1430, 2005.

DE PAULA, V. et al. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest Management Science**, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2000.

DE-CARVALHO, R. R. et al. Effects of *Euphorbia milii* latex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 235-237, 1998. Supl 1.

DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ¹H NMR spectra. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1009-1017, 2003.

DÉVÉHAT, F. L. et al. Antiviral and cytotoxic of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 400-405, 2002.

DHOOGHE, L. et al. Antiplasmodial activity of (I-3,II-3)-biflavonoids and other constituents from *Ormocarpum kirkii*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, 785-791, 2010.

DUNCAN, J. The toxicology of plants molluscicides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 243-264, 1985.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. *Piper*: a model genus for studies of evolution, chemical ecology and trophic interactions. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. **A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. New York: Kluwer Academic Publisher, 2007.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. **An introduction to the bootstrap**. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, 1993. 436 p.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides de *Piper callosum* da Amazônia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 430-431, 2006.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 229-262.

- FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 299-310, 2003.
- FERRAZ, E. R. A. et al. Differential toxicity of disperse Red 1 and disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 5, p. 489-497, 2010.
- FELIPE, F. C. B. et al. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 605-612, 2007.
- FENWICK, A.; SAVIOLI, L. Schistosomiasis elimination. **Lancet Infect Disease.**, v. 11, n. 5, p. 346-347, 2011.
- FLORES, N. et al. Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. **Planta Médica**, v. 73, p. 206-211, 2007.
- FLORES, N. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1538–1543, 2008.
- FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621-627, 2009.
- FOLMER, F. et al. Inhibition of TNF alpha-induced activation of nuclear factor kappaB by kava (*Piper methysticum*) derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 1206-1218, 2006.
- FONTENELE, J. B. et al. Antiplatelet effects of piplartine, an alkamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 511-515, 2009.
- FRATERNALE, D. et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from *Commiphora erythraea* (Ehrenb.). **England Resin Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 654-661, 2011.
- FREITAS, G. C. et al. Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 119–122, 2009.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least squares regression – A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.
- GIOVANELLI, A. et al. The molluscicidal activity of niclosamide (Bayluscide WP70[®]) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 743-745, 2002.
- GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39-48, 2009.
- GUPTA, S. et al. A new amide, N-cinnamoylpyrrole and others constituents from *Piper argyrophyllum*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 38, p. 823-827, 1999.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, 1977.

HATHAWAY, J. J. et al. Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, p. 425–435, 2010.

HENDERSO, N. T.; FARNSWORTH, N.; MYERS, T. Biochemistry of recognized molluscicidal compounds of plant origin. In: MOTT, K. E. (Ed.) **Plant molluscicides**. Chichester: John Wiley, 1987. p. 109-130.

HERMOSO, A. et al. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 3975-3980, 2003.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A procura dos princípios ativos. In: _____. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCar, 2003. p. 43-58.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Plant molluscicide research. In: MOTT, K. E. (Ed.) **Plant molluscicides**. Chichester: John Wiley, 1987. p. 299-320.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 706-716, 2001.

JOSHI, A. S. Dihydrochalcones from *Piper longicaudatum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 2, p. 186-188, 2001.

JURBERG, P.; DE VASCONCELLOS, M. C.; MENDES, N. M. Plants used as molluscicides - a critical-view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 76-83, 1989.

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

KAWANO, T. Agentes que atuam sobre a morfogênese da região cefálica de alguns moluscos. **Ciência e Cultura**, p. 116-166, 1983.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 3, p. 555-562, 1986.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). **Proceedings C**, v. 90, n. 3, p. 281-302, 1987.

KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, n. 1-2, p. 25-32, 1992.

KAWANO, T. et al. Observation of some key stages of the embryonic development of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Mollusca, Planorbidae). **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 46, p. 85-91, 2004.

- KIUCHI, F. et al. Studies on crude drugs effective on visceral larval migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in *Piper*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 2452-2465, 1998.
- KLOOS, H.; MCCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. **Journal Medical Plant Research**, v. 46, p. 195-209, 1982.
- KLOOS, H.; MCCULLOUGH, F. S. Plant with recognized molluscicidal activity. In: MOTT, K. E. (Ed.). **Plant molluscicides**. Chichester: John Wiley, 1987. p. 45-108.
- KONISHI, T. et al. Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 121-124, 2005.
- KUSEL, J. R.; GORDON, J. F. Biophysical studies of the schistosome surface and their relevance to its properties under immune and drug attack. **Parasite Immunology**, v. 11, p. 431-445, 1989.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.
- LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (PIPERACEAE). **Quimica Nova**, v. 30, p. 1222-1224, 2007.
- LARDANS, V.; DISSOUS, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 413-417, 1998.
- LEMMA, A. et al. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phytolaca dodecandra*): I. Increased potency with butanol extraction. **Journal of Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 104-104, 1972.
- LEYTON, V. et al. Atividade moluscicida de principios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia Série Zoologia**, v. 92, n. 2, p. 213-216, 2005.
- LIN, L. C. et al. Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*. . **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 842-844, 2006.
- LUIZE, P. S. et al. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n.10, p. 2126-2130, 2006.
- LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
- MA, C. F. et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Artemisia annua* L. in different stages of development by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 412-419, 2008.

MABBERLEY, D. **The plant-book**: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858 p.

MARQUES, J. V. et al. Antifungal amides from *Piper scutifolium* and *Piper hoffmanseggianum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 2036-2039, 2007.

MARTINS, R. C. et al. Trypanosidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

MATA, R. et al. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1961-1968, 2004.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized linear models**. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1989. 532 p.

MCCULLOUGH, F.; MOTT K.E. The role of molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin World Health Organization**, p. 1-13, 1983.

MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 183-187, 1998.

MCFERREN, M. A. et al. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 201-207, 2002.

MIRANDA, J. E. et al. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 2, p. 557-563, 2002.

MIYASATO, P. A. et al. Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 1873-1879, 2012.

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

MORANDIM, A. D. E. A. et al. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 282-286, 2005.

MOUNT, D. I. E.; NORBERG, T.J. A seven day life cycle cladoceran toxicity test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, p. 425-434, 1984.

NAKANO, E. et al. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, v. 536, p. 145-154, 2003.

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

NAVICKIENE, H. M. et al. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, n. 5, p. 281-284, 2003.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, p. 370-384, 1972.

ODONNE, G. et al. Antileishmanial sesquiterpene lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a traditional remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru). Part III. **Journal of Ethnopharmacology** . v. 137, n. 1, p. 875-879, 2011.

OLIVEIRA, L. C. P.; MAUSE, R.; NUNOMURA, S. M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1439-1442, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* látex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 342-350, 2000.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; LOPES, R. M.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, v. 56, p. 369-374, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 218-227, 2010.

ORJALA, J. et al. Two chromenes and a prenylated benzoic-acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993a.

ORJALA, J. et al. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Medica**, v. 59, n. 6, p. 546-551, 1993b.

ORJALA, J. et al. Aduncamide, a cytotoxic and antibacterial beta-phenylethylamine-derived amide from *Piper aduncum*. **Natural Products Letters** v. 2, n. 3, p. 231-236, 1993c.

OYEDEJI, O. A. et al. Essential oil composition of *Piper guianense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 362-364, 2005.

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

PARMAR, V. S. et al. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1069-1078, 1998.

PARVEEN, I. et al. Application of gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling techniques to the analysis of heathland plant diets of sheep. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1129-1138, 2007.

- PASI, S. et al. Biologically active triterpenoids from *Cephalaria ambrosioides*. **Planta Medica**, v. 75, p. 163-167, 2009.
- PAULINI, E. Current status of knowledge of molluscicides. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 17, n. 4, p. 355-362, 1965.
- PAVÒN, J. L. P. et al. Differentiation of types of crude oils in polluted soil samples by headspace-fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 109, p. 101–109, 2006.
- PEREIRA, A. R. Molluscicidal metabolites from an assemblage of *Palmyra atoll* cyanobacteria. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1175–1181, 2011.
- PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.
- POINTIER, J. P.; GIBODA, M. The case for biological control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 10, p. 395-397, 1999.
- RAMOS, L. S. et al. Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 712-713, 1986.
- RAMZAN, I.; TRAN, V. H. Kava from ethnology to pharmacology. In: SINGH, Y. N. **Chemistry of kava and kavalactones**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. p. 77-103.
- RAPADO, L. N. et al. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, v. 85, n. 1, p. 66-72, 2010.
- RÉ, L.; KAWANO, T. Effects of *Laurus nobilis* (Lauraceae) on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 315-320, 1987.
- REIGADA, J. B. **Bioprospeção em espécies de Piperaceae**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008. 884 p.
- RIBEIRO, K. A. L. et al. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, p. 44–50, 2009.
- RIBEIRO, T. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, 2004.
- RODRIGUES, R. V. et al. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 10, p. 1809-1812, 2009.

- RODRIGUES, S. et al. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, n. 116, p. 569-573, 2011.
- RUDDOCK, P. S. et al. Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 2, 2011.
- RUKACHAISIRIKUL, T. et al. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 173-176, 2004.
- SAKAI, T. et al. Flavokawain B, a kava chalcone, induces apoptosis in synovial sarcoma cell lines. **Journal of Orthopaedic Research Month**, p. 1-6, 2011.
- SANTOS, A. F. et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 135-139, 2007.
- SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 794–798, 2010.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 404-434.
- SCHALL, V. T. et al. The molluscicidal activity of crown of christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 1, p. 7-10, 1998.
- SCHALL, V. T. et al. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 79, n. 2, p. 165-70, 2001.
- SIDDIQUI, B. S. et al. An amide from fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1617-1619, 1997.
- SILVA, D. R. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of *Piper ovatum* Vahl. **Molecules**, v. 16, n. 14, p. 1171- 1182, 2009.
- SINGH, S. K.; YADAV, R. P.; SINGH, A. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2010.
- SKELLY, P. J.; ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, p. 185-284, 2006.
- SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: Fiocruz/CPqRR, 1990. 76 p.

SUKUNILA, E.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 339-346, 2004.

SZLISZKA, E. et al. Chalcones enhance trail-induced apoptosis in prostate cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1-13, 2010.

TABOPDA, T. K. et al. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Pytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1726-1731, 2008.

TAKAHASHI, F. Y. **Efeitos de Piperaceae em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Planorbidae)**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2011.

TALLARICO, L. et al. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research**, v. 561, p. 139-145, 2004.

TANG, J. et al. Kavalactones Yangonin and Methysticin induce apoptosis in human hepatocytes (HepG2) in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 3, p. 417-423, 2011.

TEAM, R. D. C. **A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2010.

TEMPONE, A. G. et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2008.

TESCHKE, R.; QIU, S. X.; LEBOT, V. Herbal hepatotoxicity by kava: update on pipermethystine, flavokavain B, and mould hepatotoxins as primarily assumed culprits. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 9, p. 676-681, 2011.

TESCHKE, R.; SARRIS, J.; SCHWEITZER, I. Kava hepatotoxicity in traditional and modern use: The presumed Pacific kava paradox hypothesis revisited. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 170-174, 2011.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1234-1241, 1999.

TRAMUJAS, F. F. et al. Reproductive aspects of zebrafish, *Danio rerio*, exposed to sublethal doses of deltamethrin). **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2006.

UTZINGER, J. et al. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 1487-1495, 2003.

VERAS, L. M. et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2012.

VIEIRA, S. C. H. et al. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

WATTANATHORN, J. et al. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3106-3110, 2008.

WEBBE, G. Molluscicide in the control of schistosomiasis. In: MOTT, K. E. (Ed.). **Plant Molluscicides**. Chichester: John Wiley, 1987. p. 1-26.

WEBER, C. I. et al. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. In:_____. **Environmental monitoring systems laboratory**. 2nd ed. Cincinnati, OH: Environmental Protection Agency, 1989. p.25-72.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert committee on bilharziasis: first report**. Geneva, 1953. (Technical report series, 53).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicides. **World Health Organ Technical Report Serie**, v. 214, p. 1-59, 1961.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiology and Control of Schistosomiasis**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1967. (Technical report series, 372).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis control**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1973. v. 515, p. 1-47.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiology and control of schistosomiasis. **World Health Organ Technical Report Serie**, v. 649, p. 1-76, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the scientific working group on plant molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 12, n. 1, p. 11, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of informal consultation on research on the biological control of snail intermediated hosts. **Bulletin of the World Health Organization**, p. 41, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis. **World Health Organ Technical Report Serie**, v. 728, p. 1-113, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The role of mollusciciding in Schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 107, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert Committee. **World Health Organ Technical Report Serie**, v. 830, p. 1-86, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and Control of Schistosomiasis and soil-transmitted Helminthiasis**: report of a WHO Expert Committee. Geneva, 2002. (Technical report series, 912).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. **World Health Organization**, v. 9, n. 86, p. 73-80, 2011.

XIAO, X. et al. Amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. **Zhongcaoyao**, v. 36, p. 508-510, 2005.

XUAN, T. D. et al. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 188-194, 2008.

YAMAGUCHI, L. F. et al. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1838-1843, 2006.

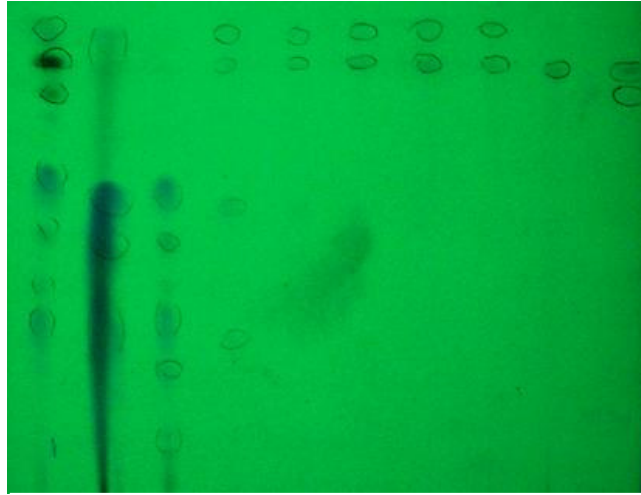
YAMAMOTO, M. M. et al. Molluscicidal activity of three Brazilian plant species. **Fitoterapia**, v. 57, n. 1, p. 59-62, 1996.

ZHOU, P. et al. Flavokawain B, the hepatotoxic constituent from kava root, induces GSH-sensitive oxidative stress through modulation of IKK/NF- κ B and MAPK signaling pathways. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 1-11, 2010.

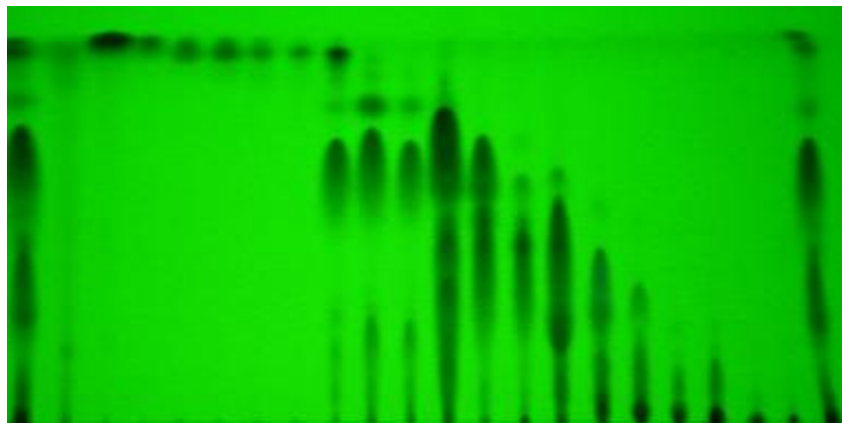
ZI, X.; SIMONEAU, S. A. Apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice of bax protein-dependent and mitochondria-dependent induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement flavokawain. **Cancer Research**, v. 65, p. 3479-3486, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 577-614.

APÊNDICE A - Perfil cromatográfico das frações A1 – A9, B1 – B20 e C1 - C21 obtidas por cromatografia em camada fina (CCD – alumínio, Sílica gel 60F₂₅₄) com sistema eluente de Hex e AcOEt (6:4) no comprimento de onda de 254 nm.



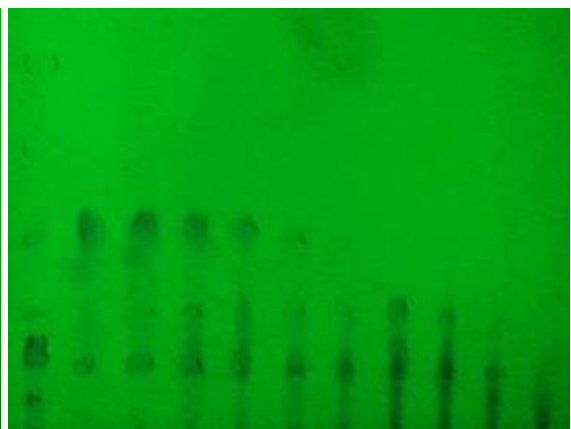
A A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9



B B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12 B13 B14 B15 B16 B17 B18 B19 B20 B

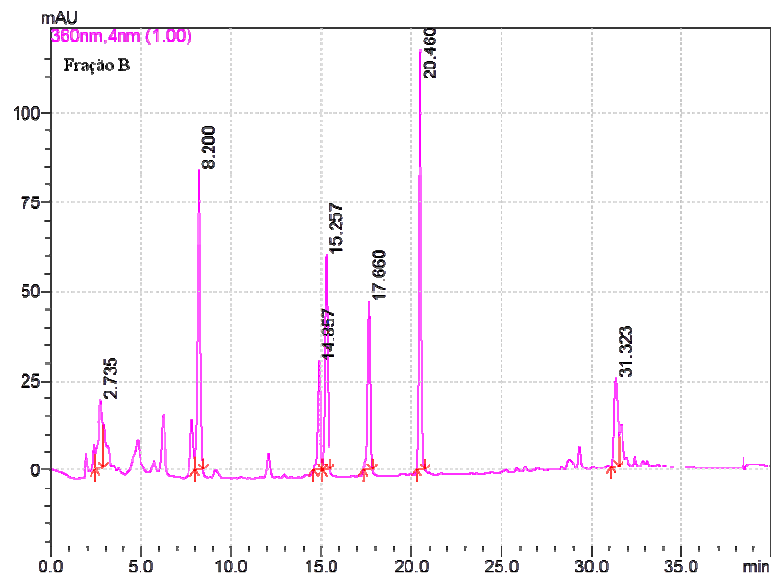
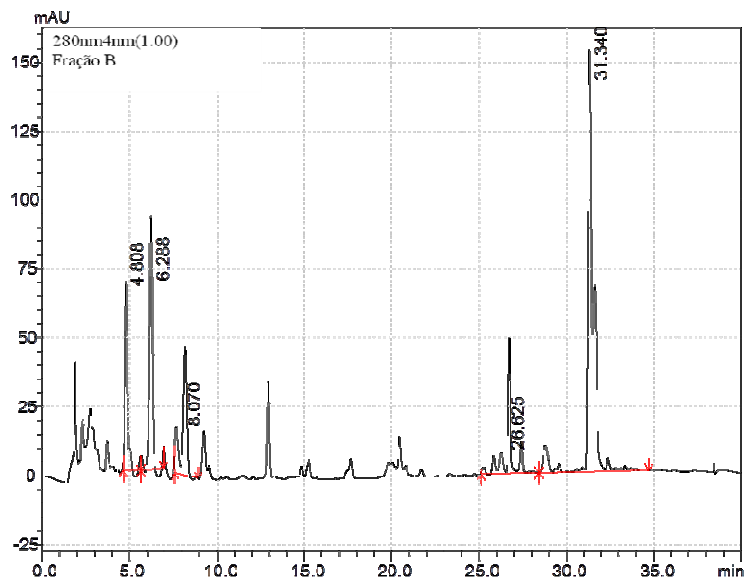
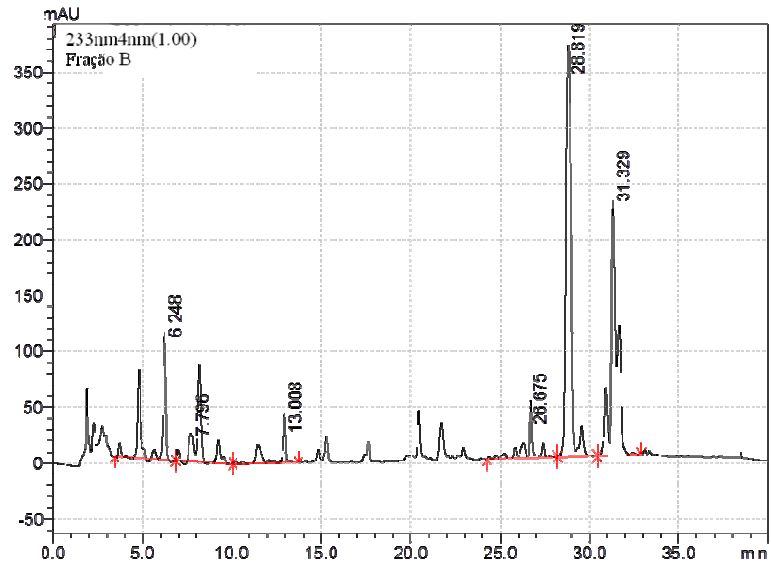


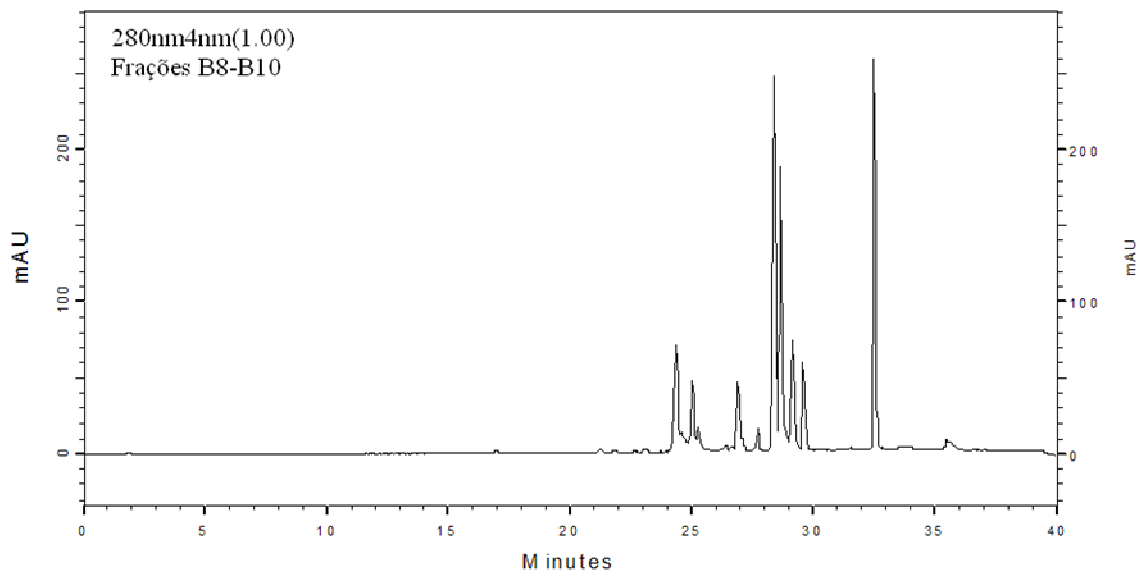
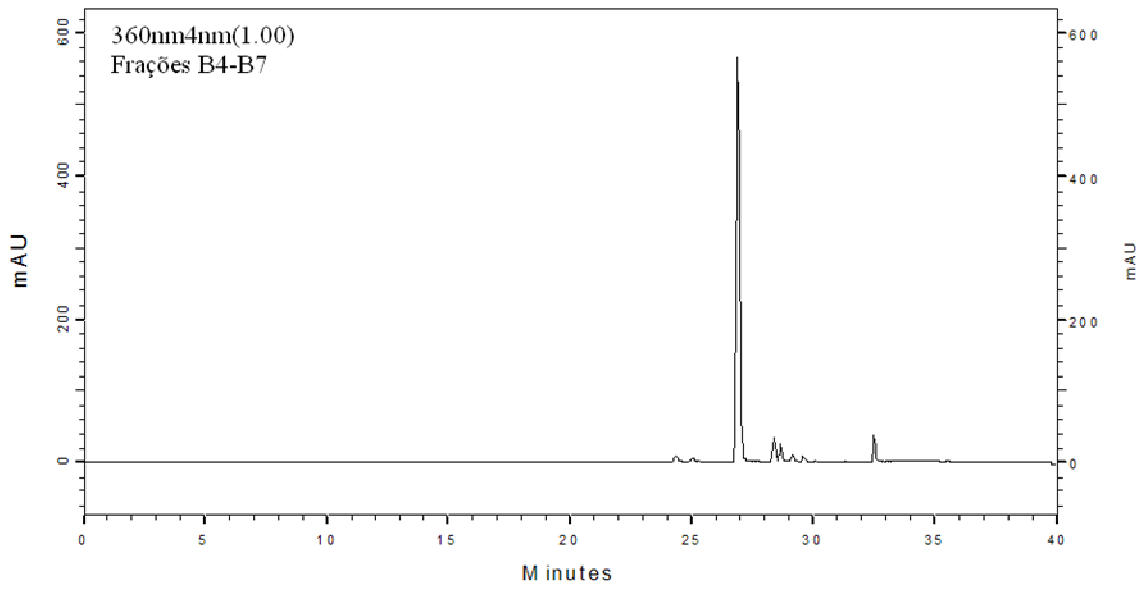
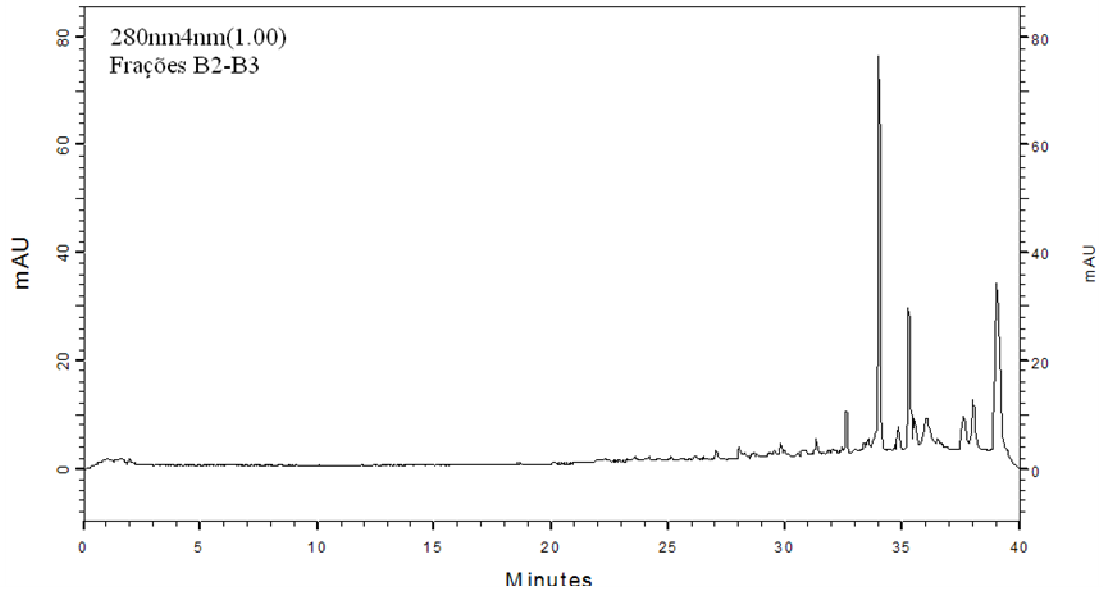
C C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11

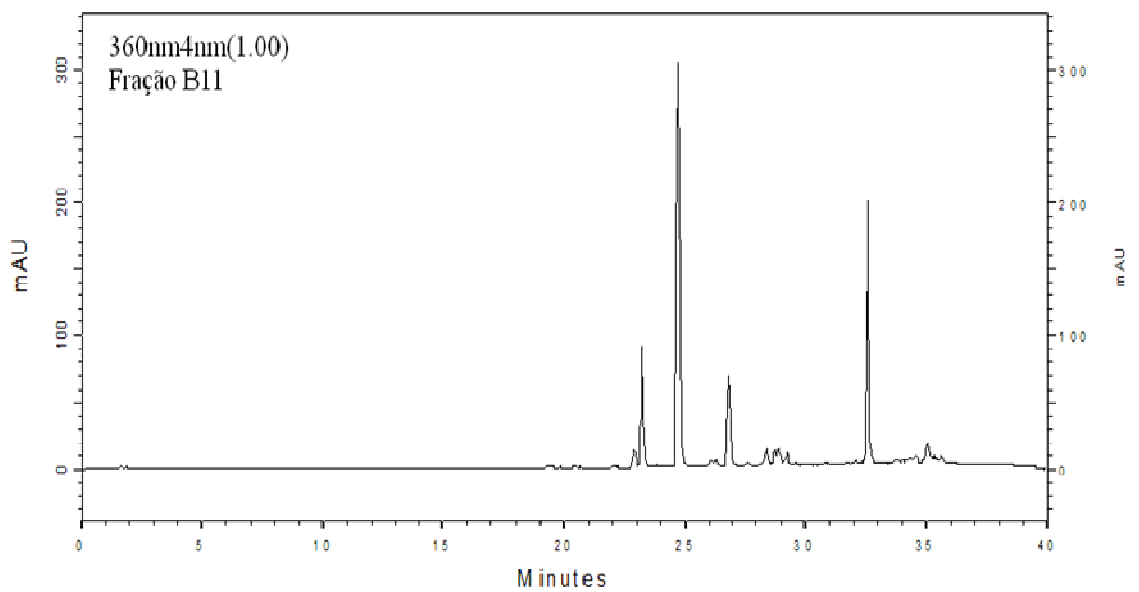
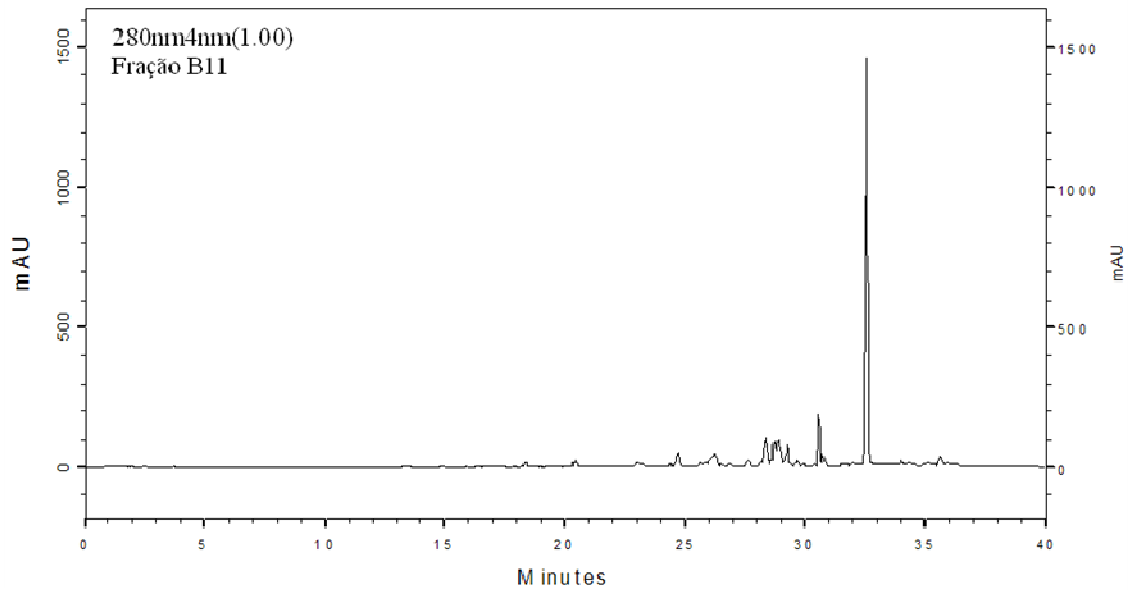
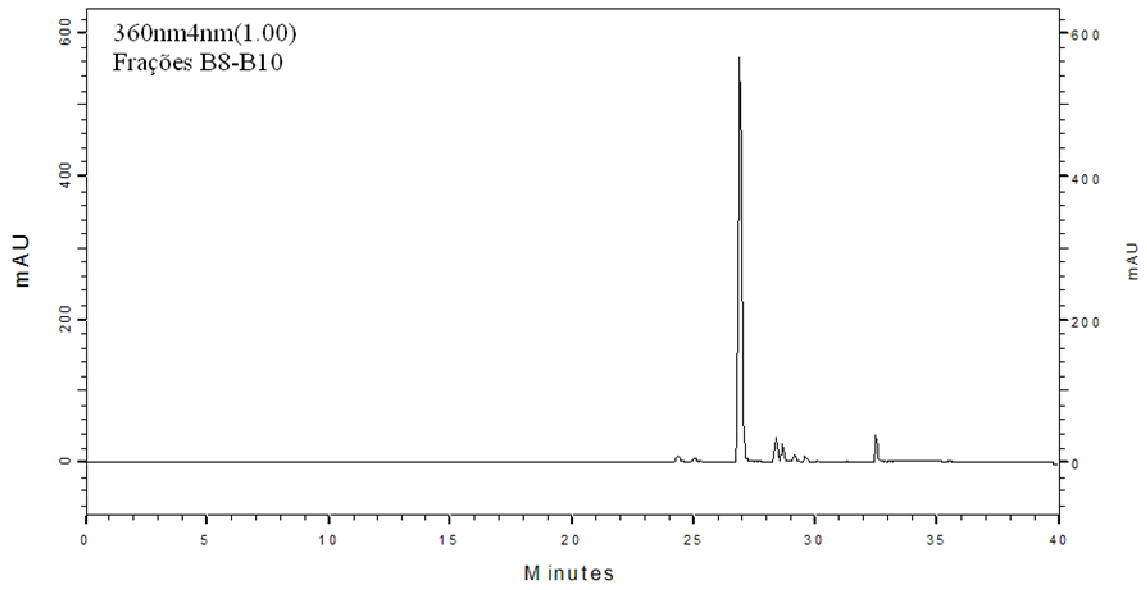


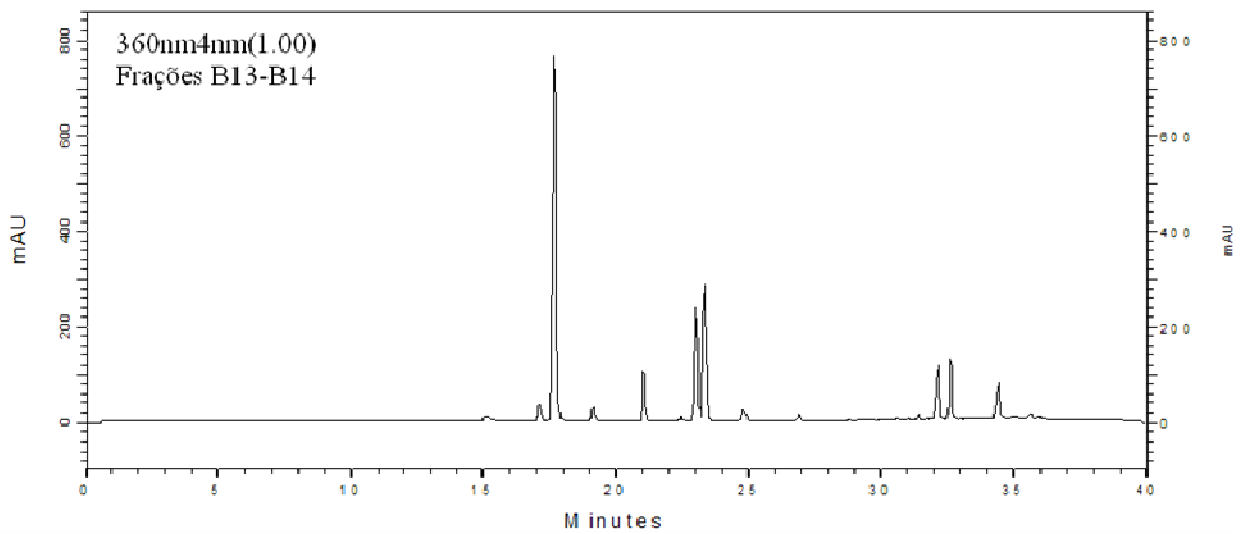
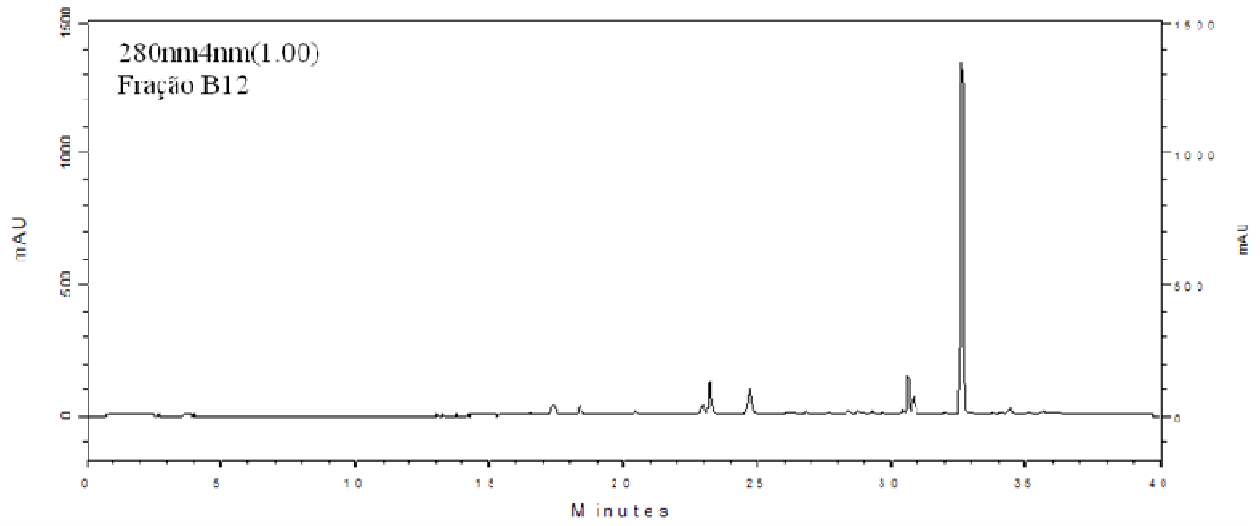
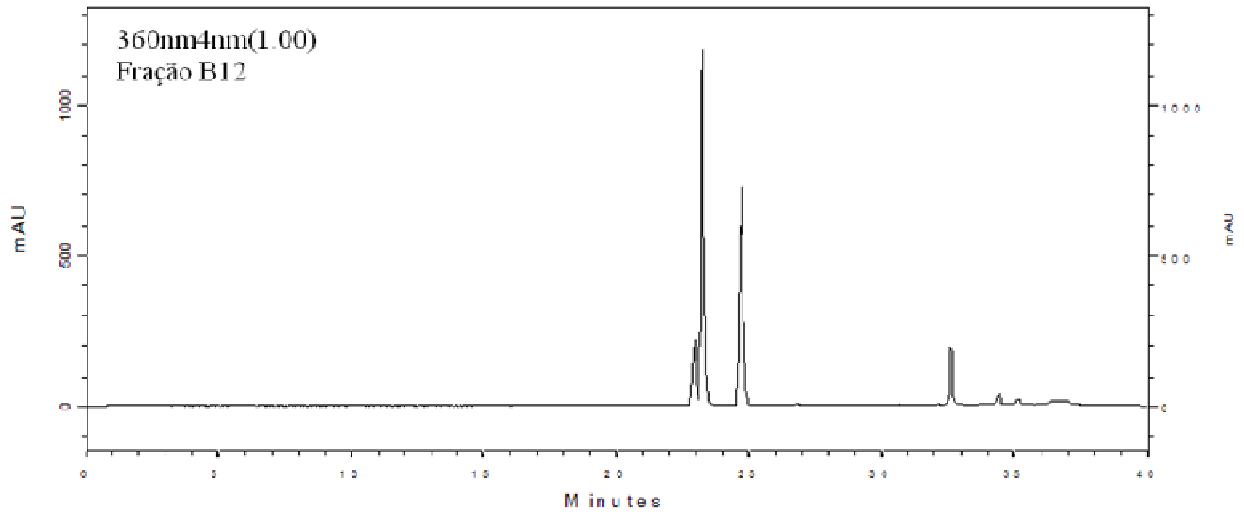
C C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19 C20 C21

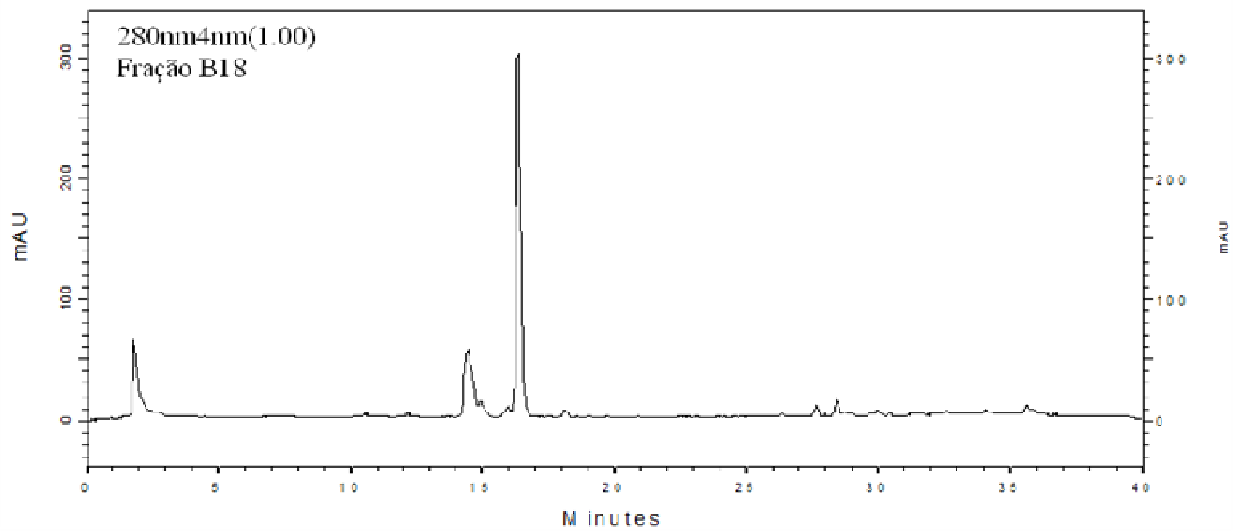
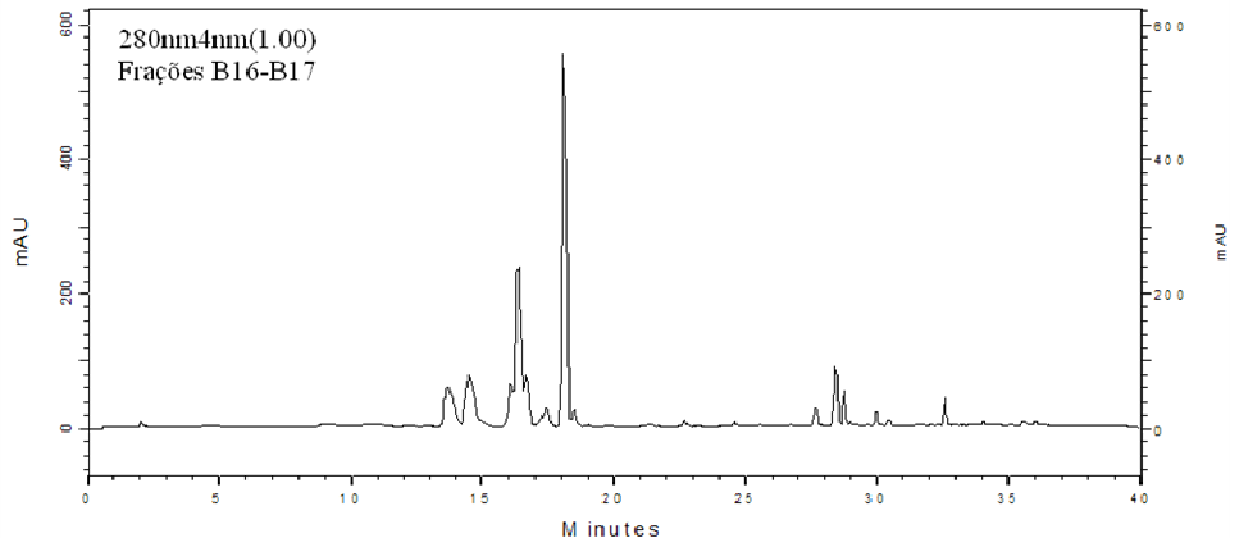
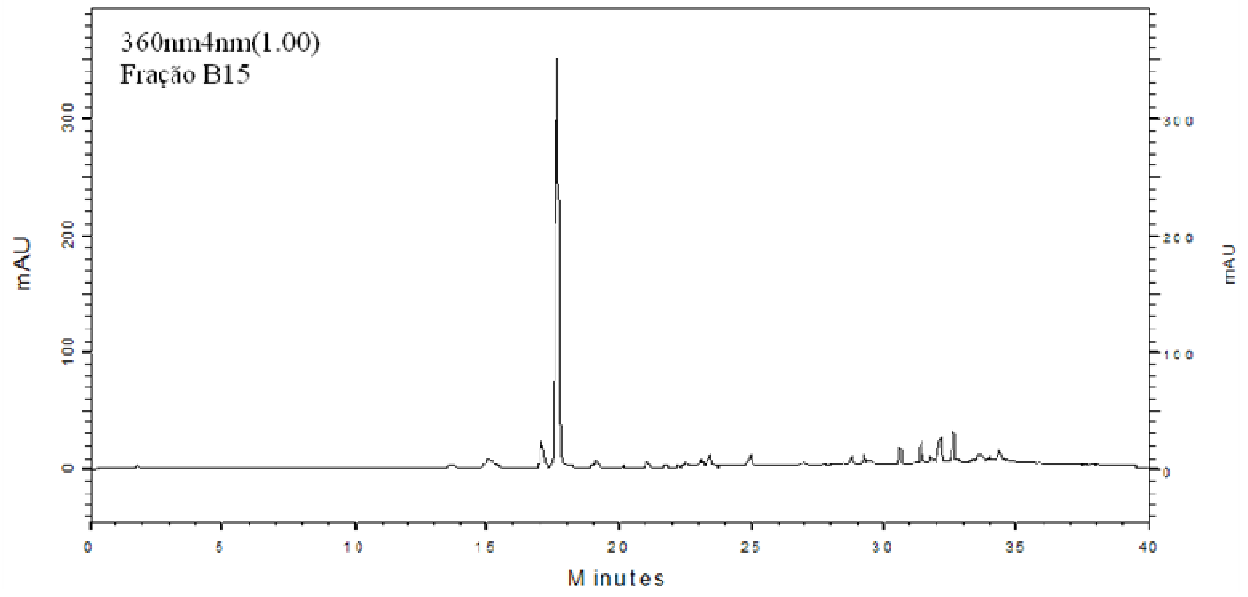
APÊNDICE B – Cromatogramas das frações obtidas por CLAE (λ 237/280/330/360) durante o fracionamento de *P. diospyrifolium*.

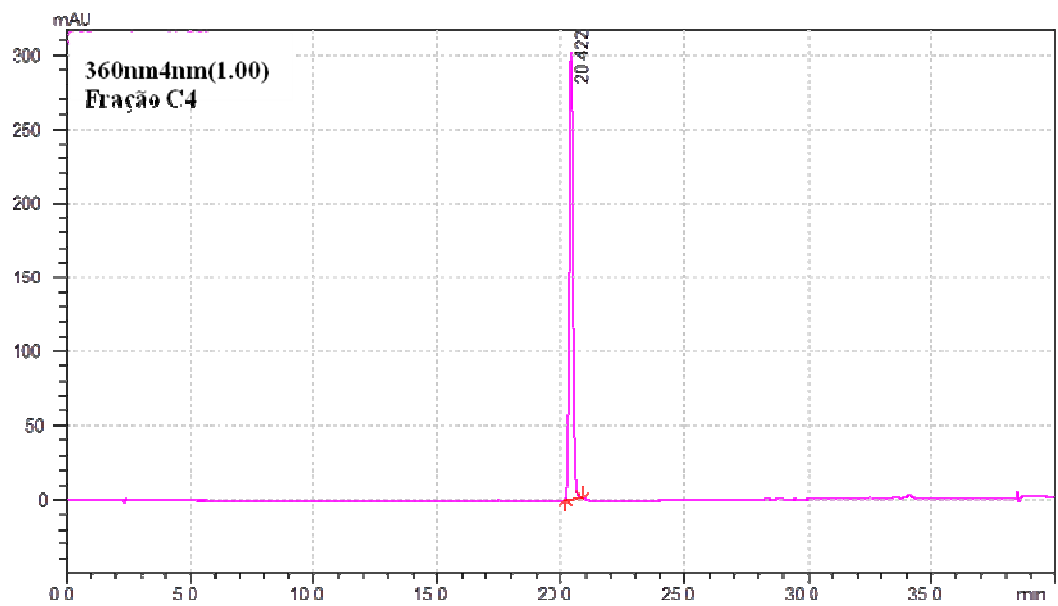
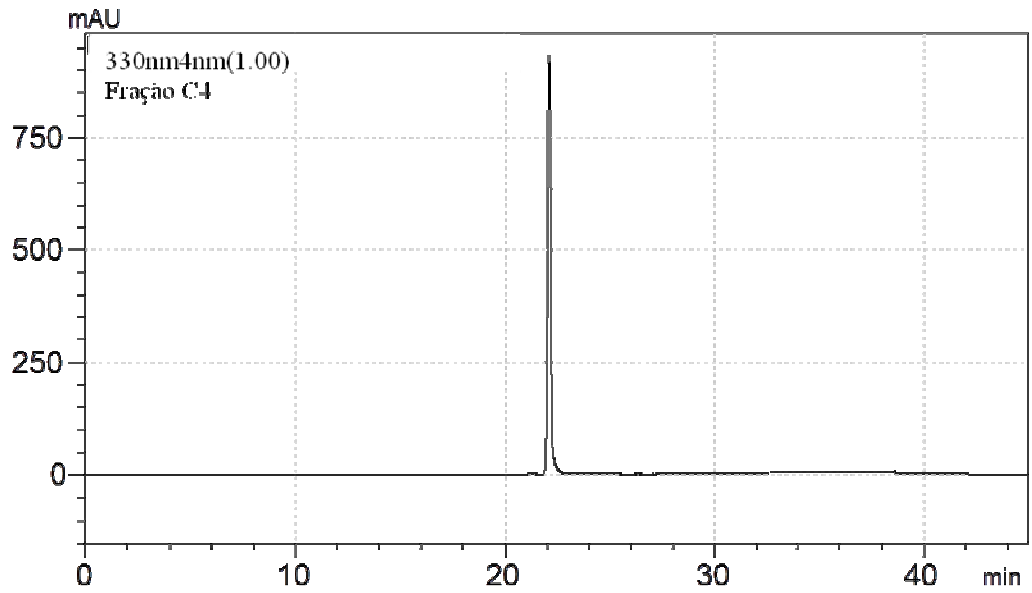
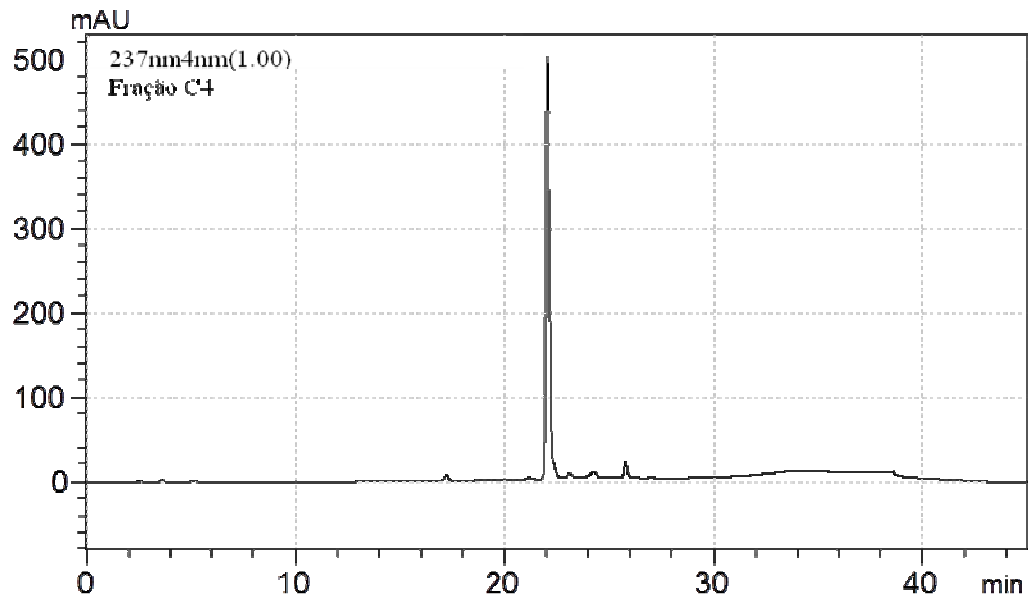


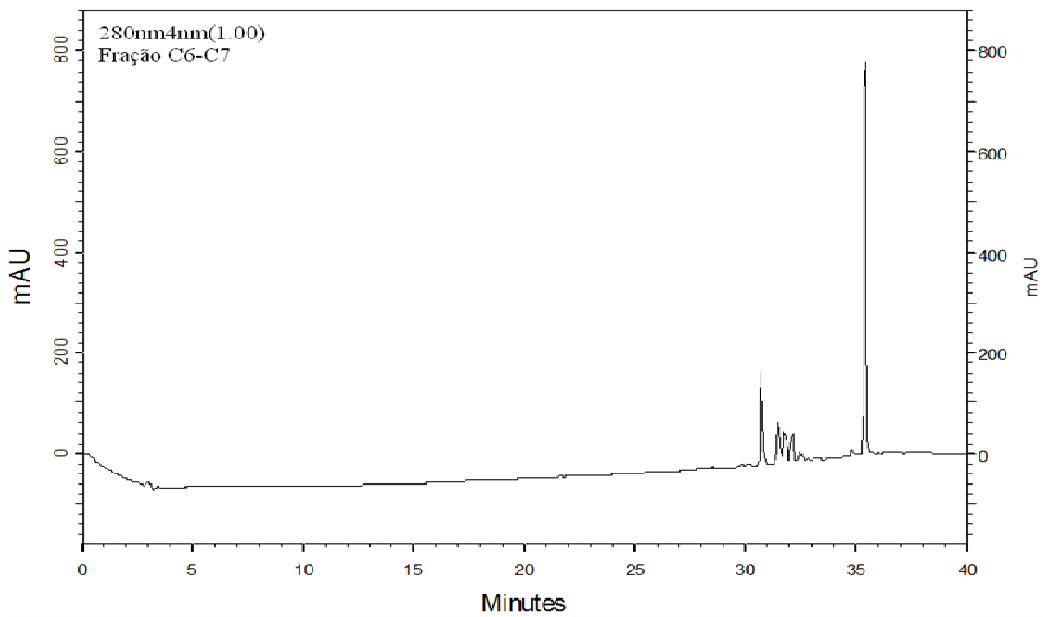
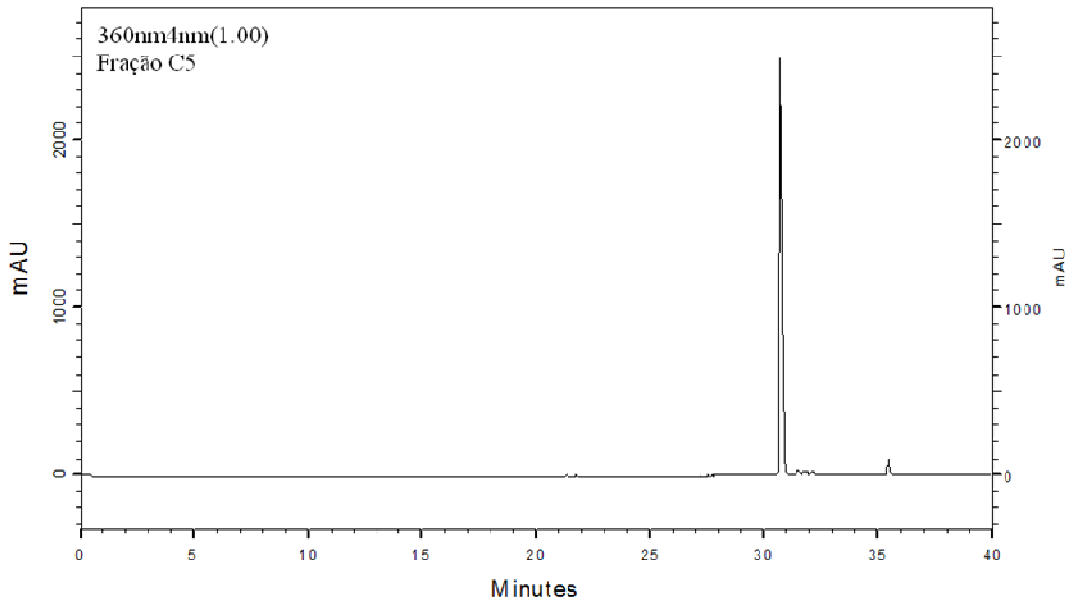
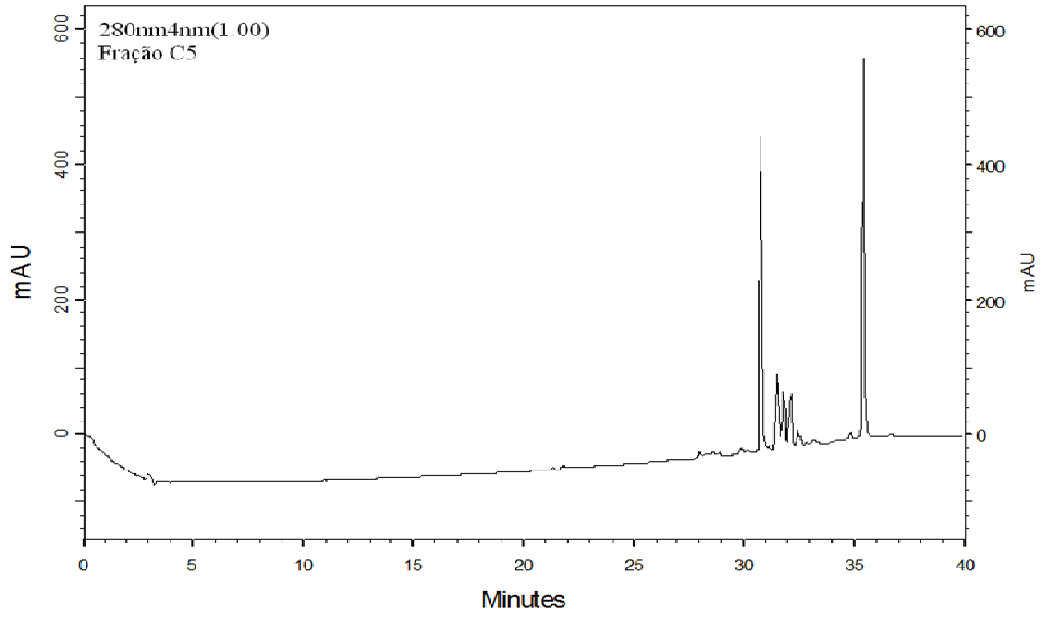


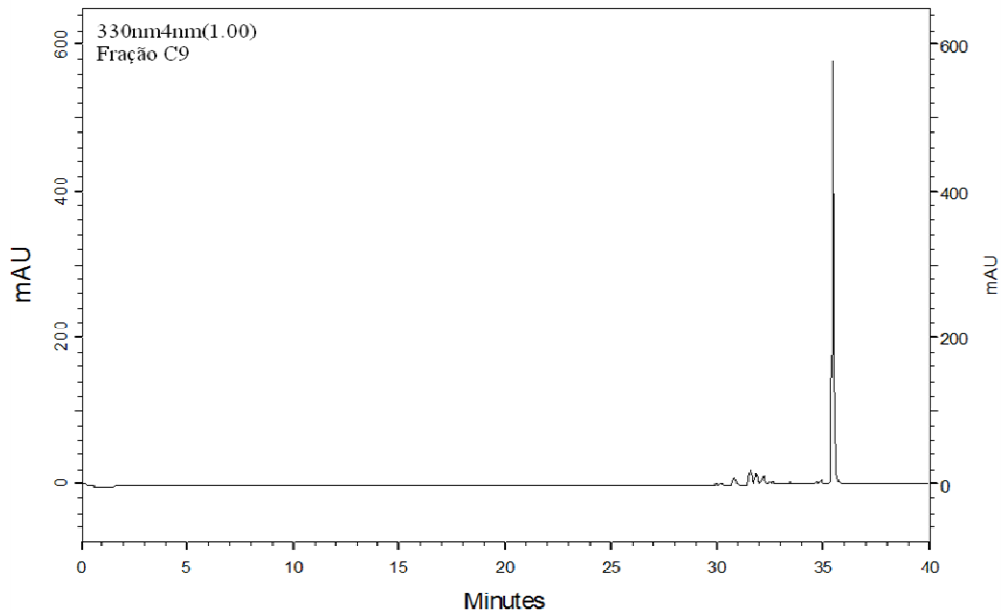
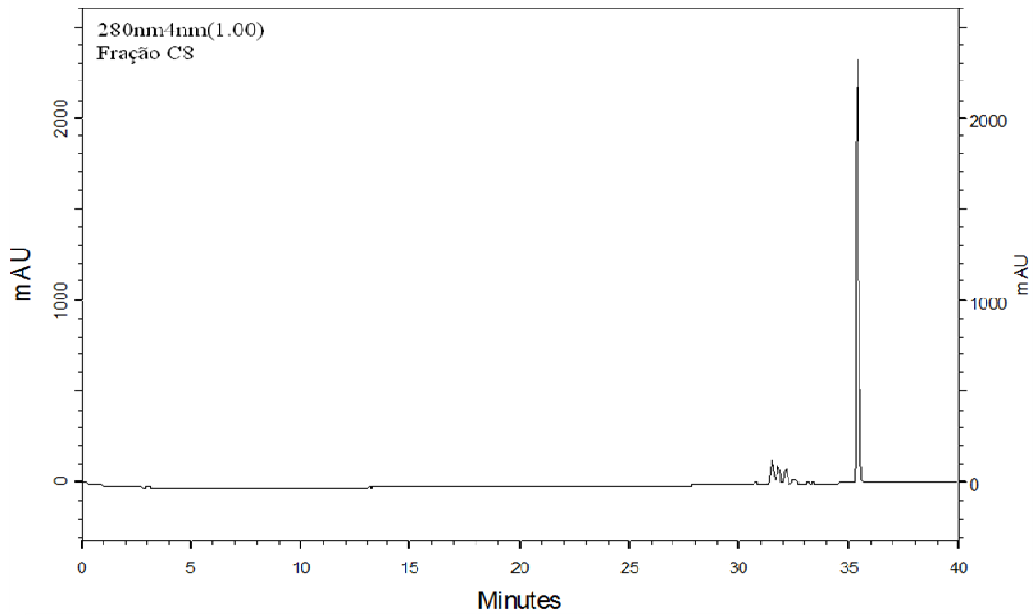
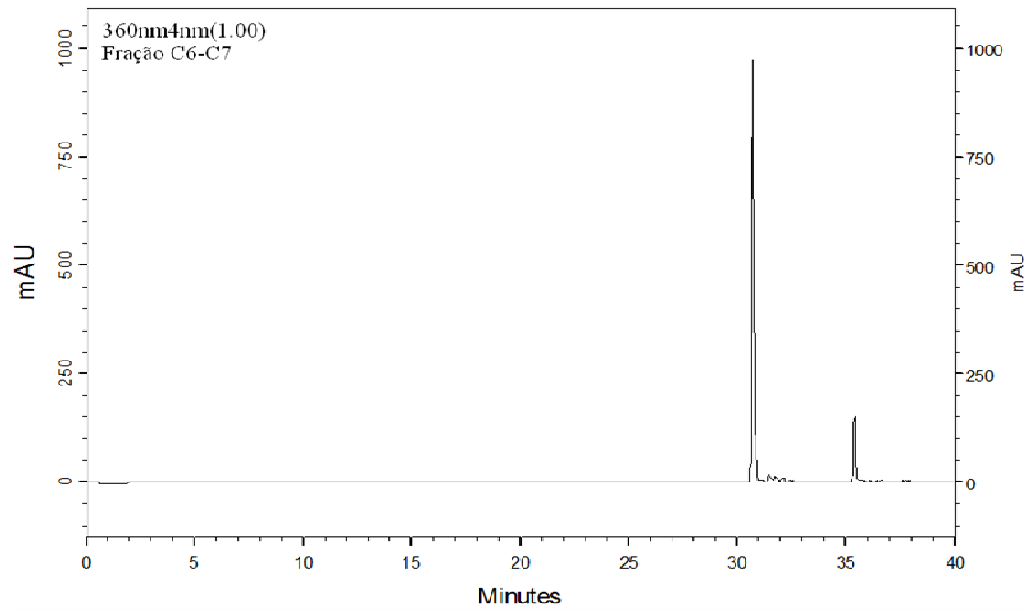


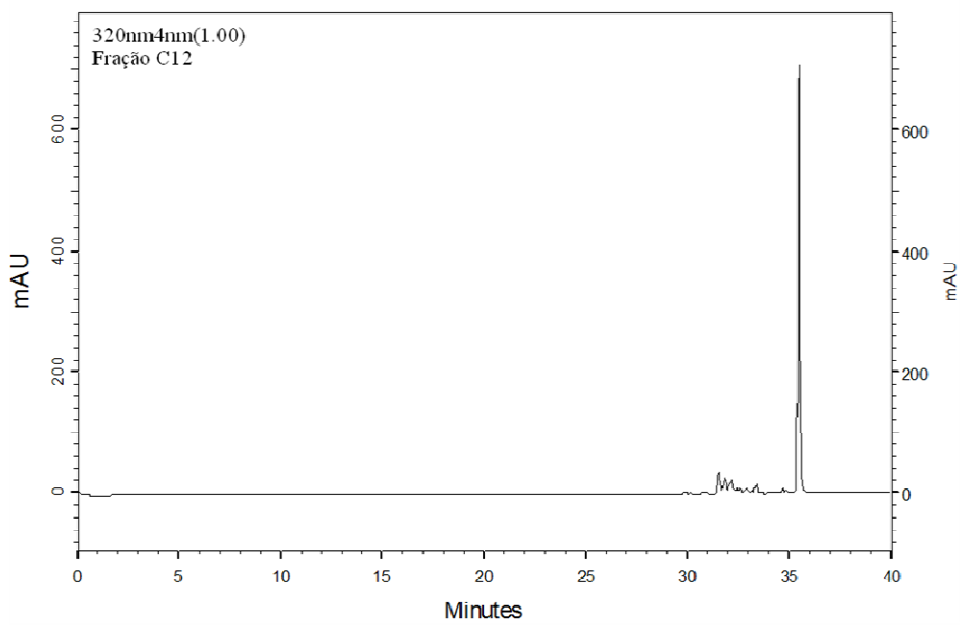
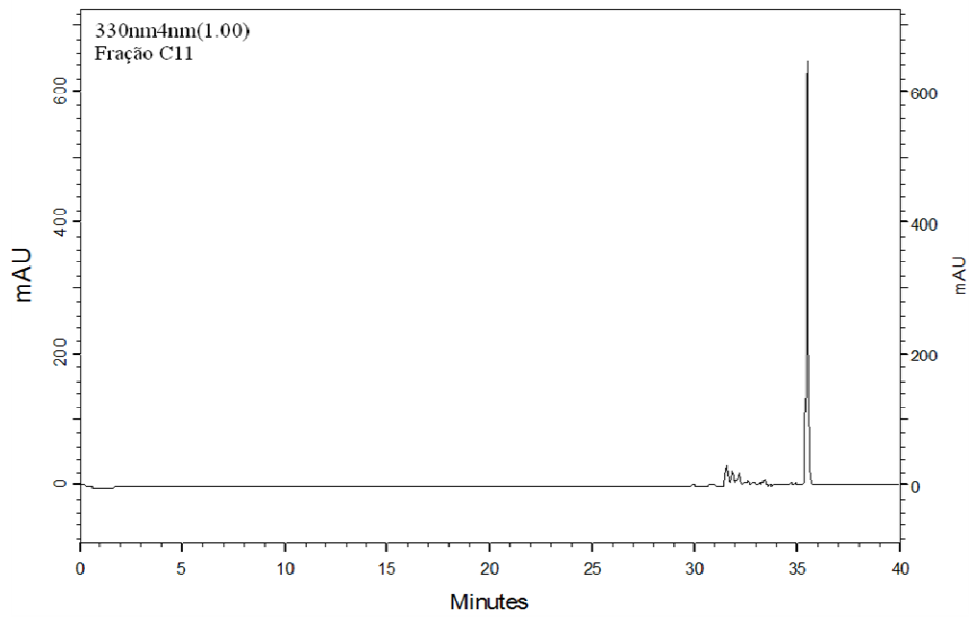
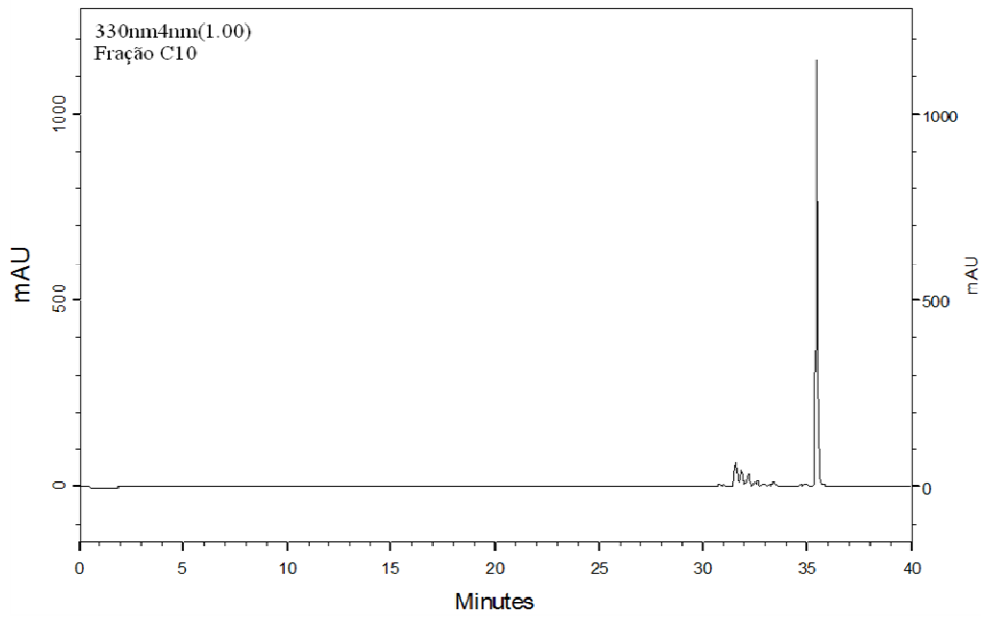


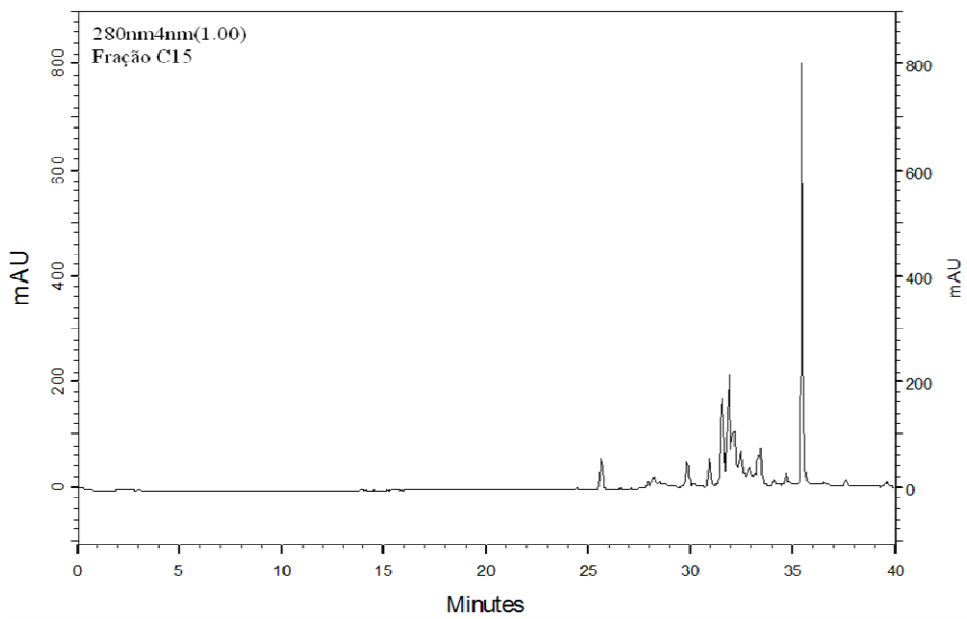
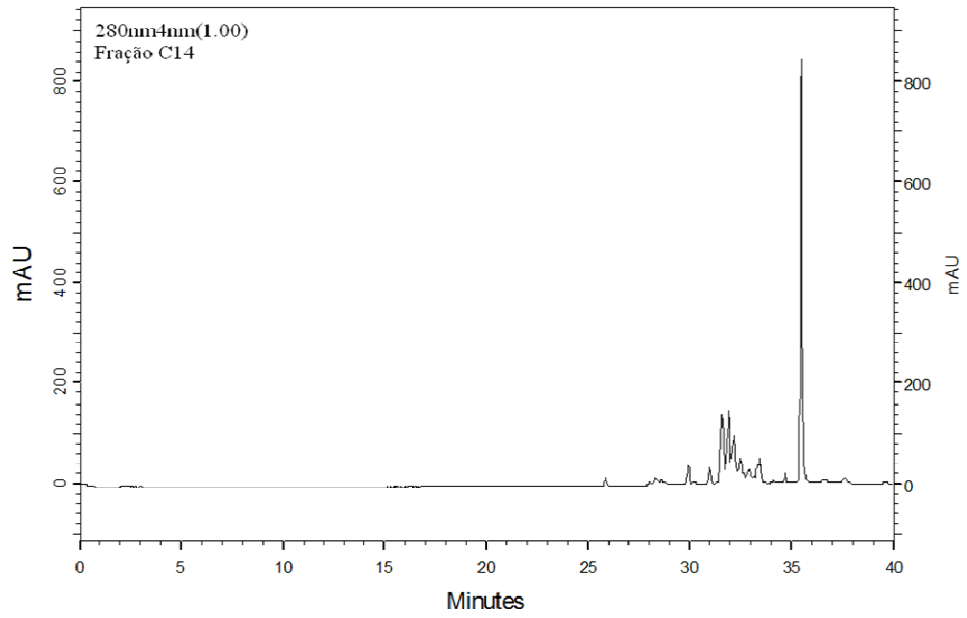
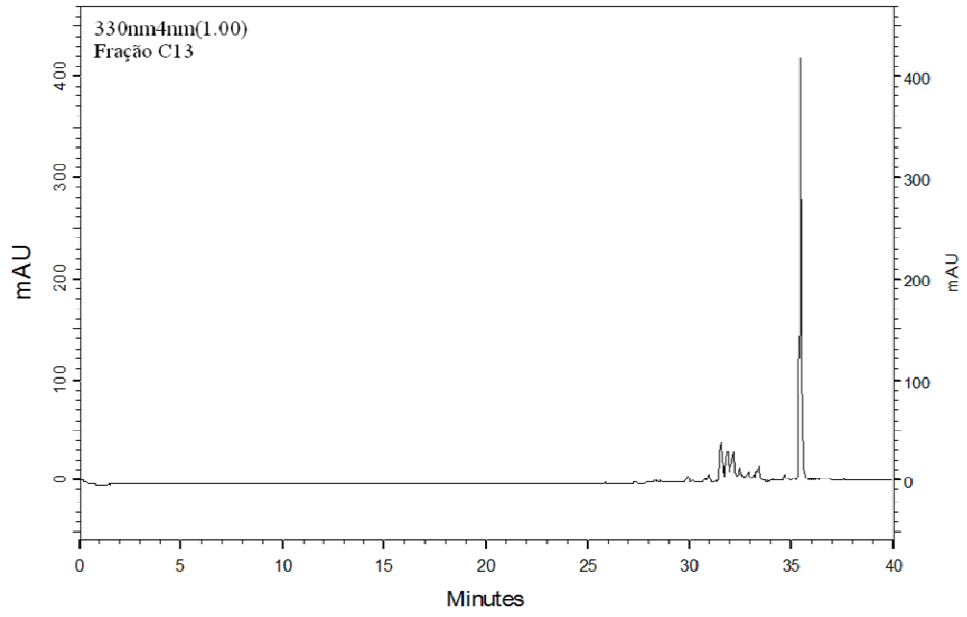


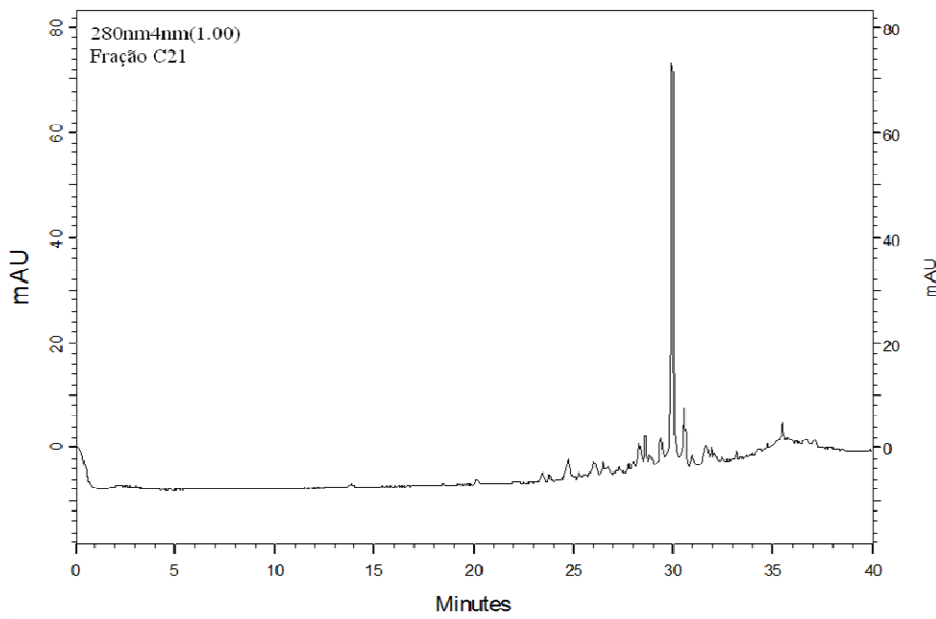
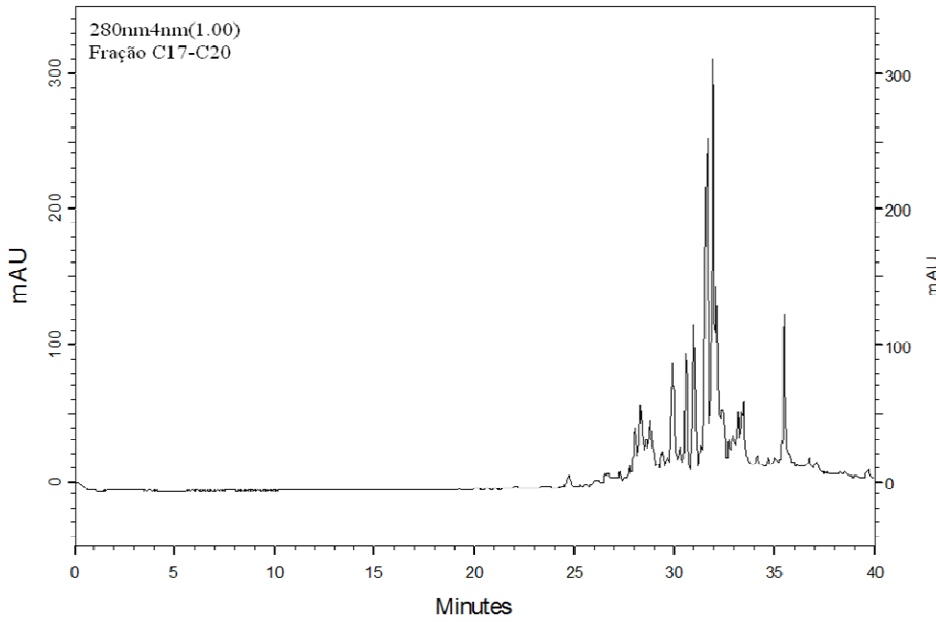
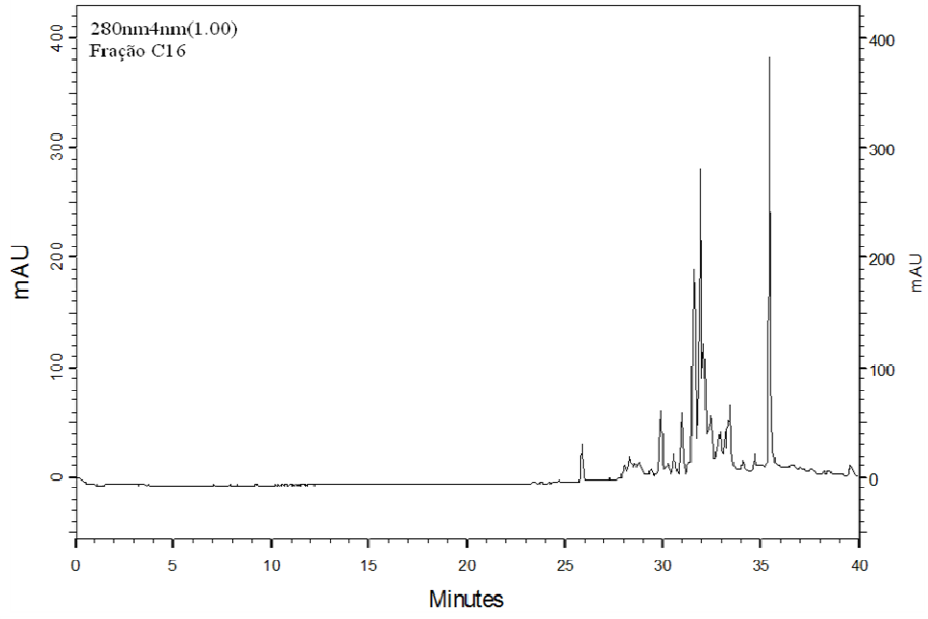




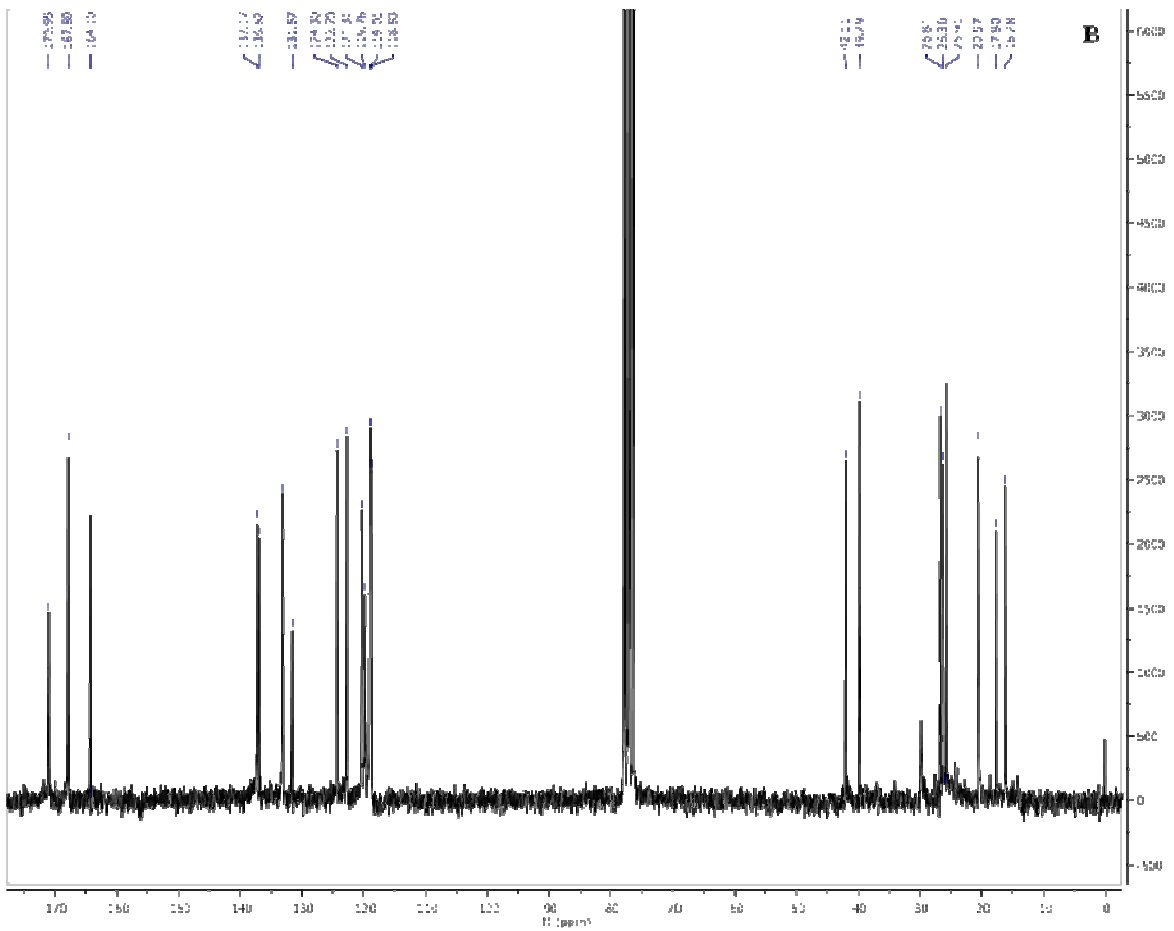
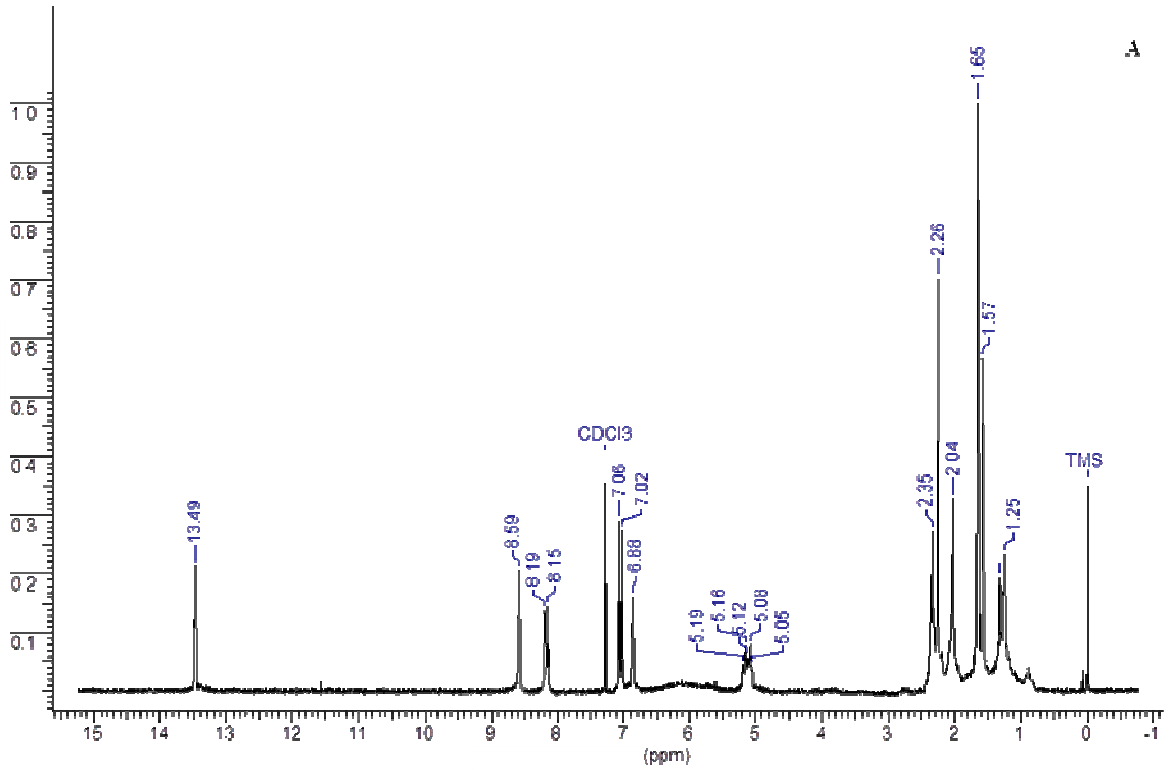




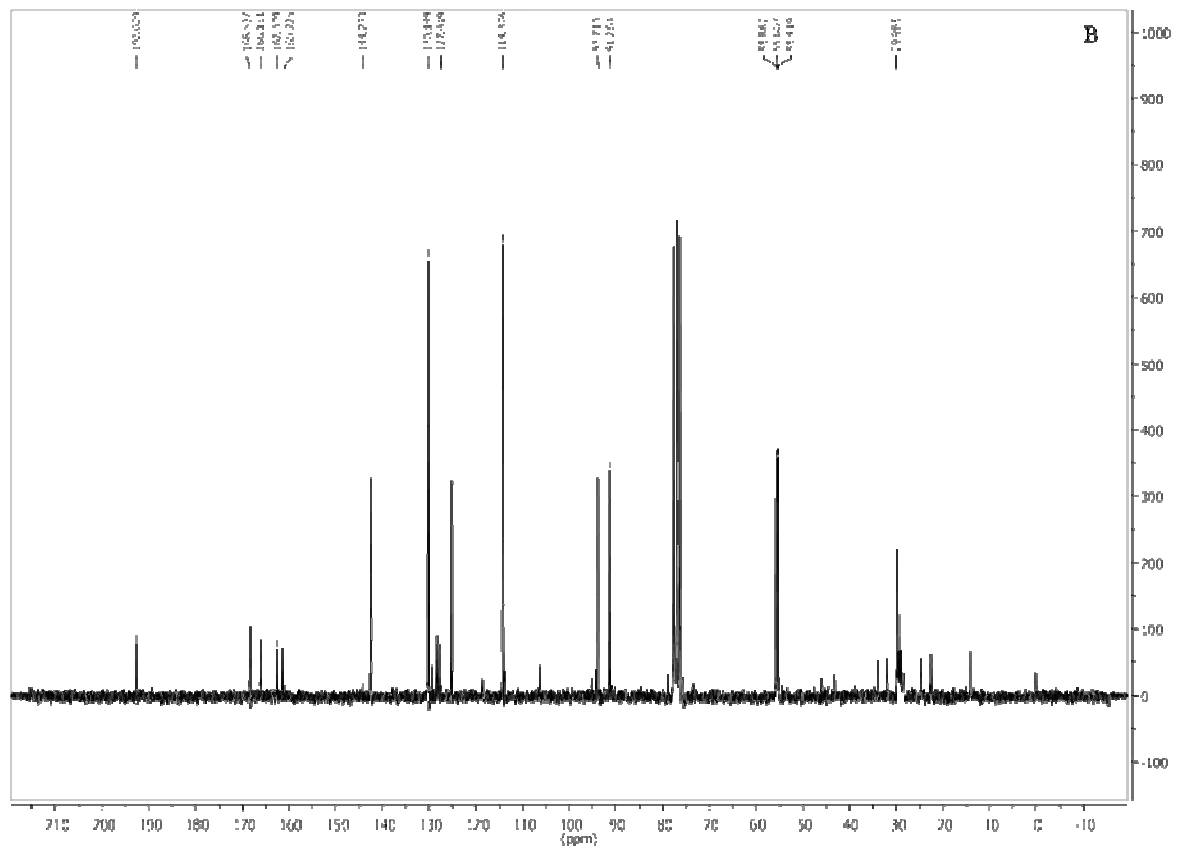
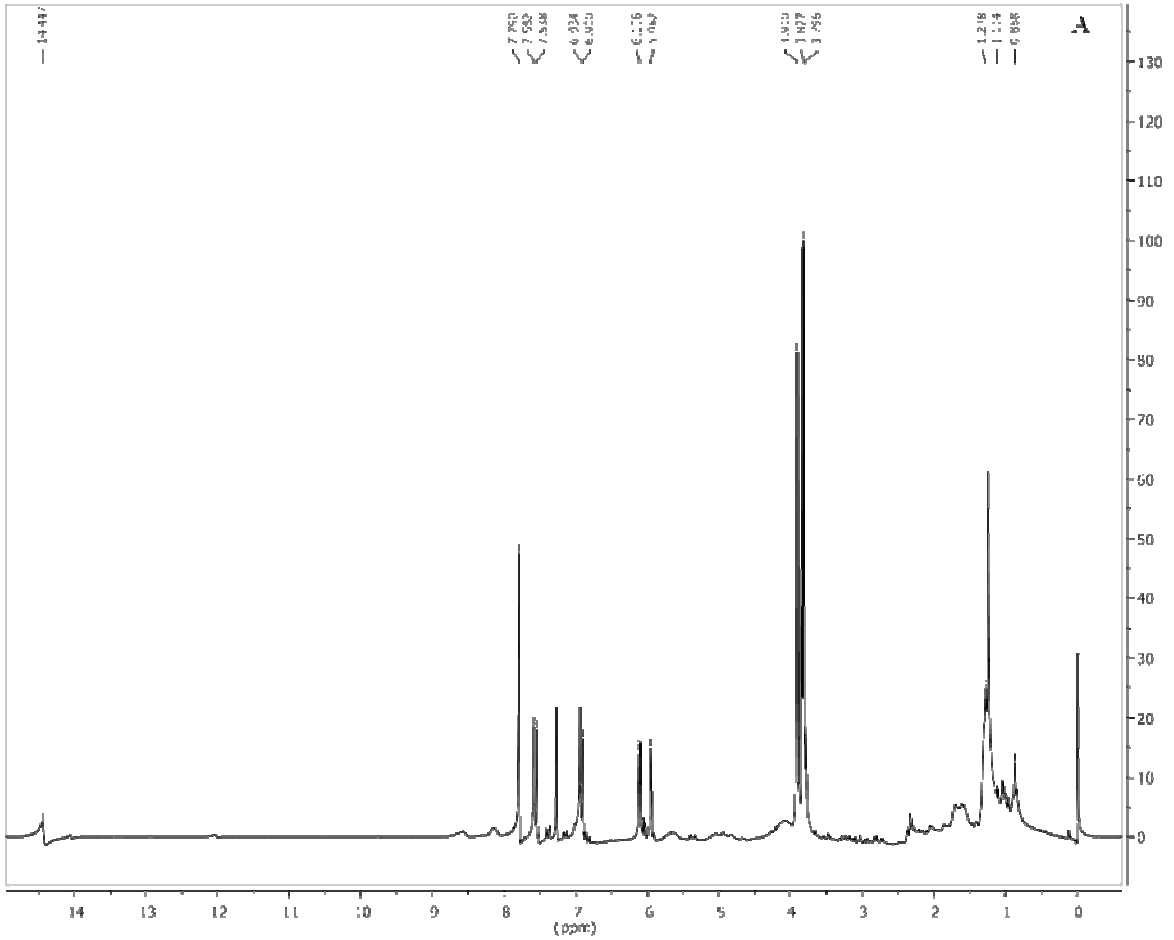




APÊNDICE C - Espectros de RMN – **A** ^1H (CDCl_3 , 200MHz) e **B** ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) do 4-hidroxi-3-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) benzoico.

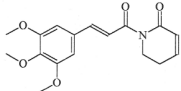
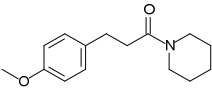
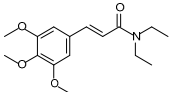
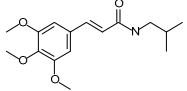
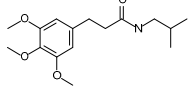
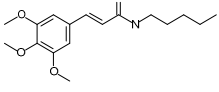
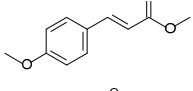
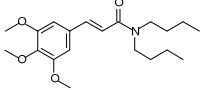
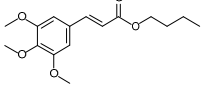
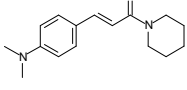
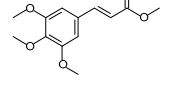
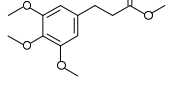
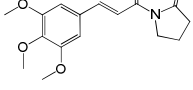
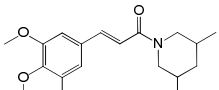
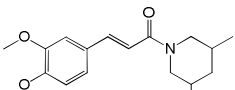


APÊNDICE C - Espectros de RMN – **A** ^1H (CDCl_3 , 200MHz) e **B** ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) da flavocavaina A.

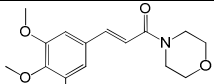
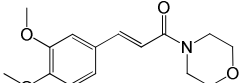
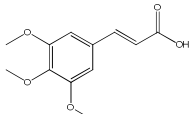
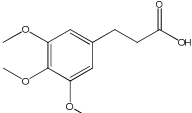
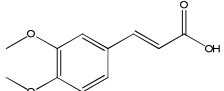
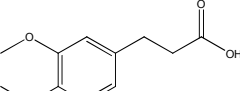
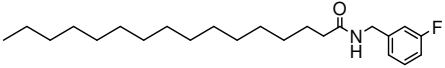
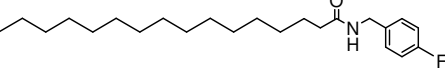
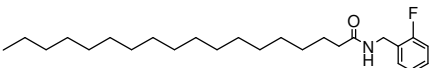
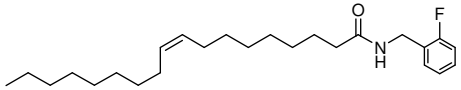
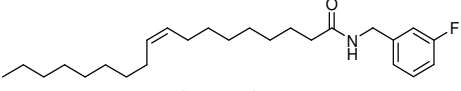
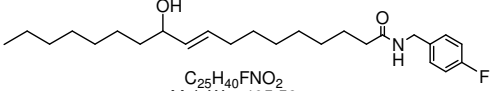


APÊNDICE D - Atividade moluscicida em *B. glabrata* adulto de análogos da piplartina e amidas de origem sintética na concentração de 10 ppm.

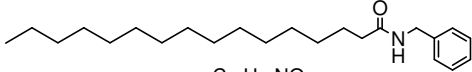
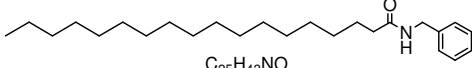
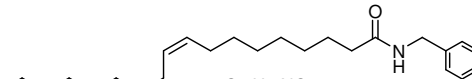
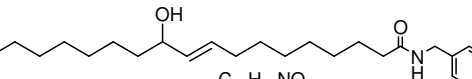
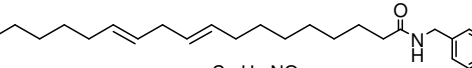
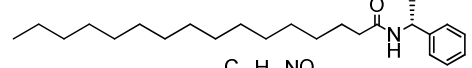
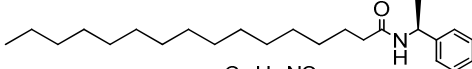
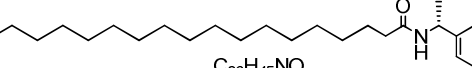
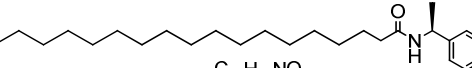
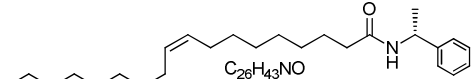
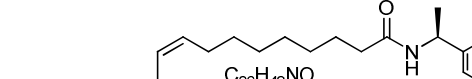
(continua)

Estrutura química	Origem	Atividade moluscicida (%)
	piplartina	100
	análogo sintético	40
	análogo sintético	30
	análogo sintético	0
	análogo sintético	20
	análogo sintético	0
	análogo sintético	0
	análogo sintético	20
	análogo sintético	0
	análogo sintético	0
	análogo sintético	20
	análogo sintético	10
	análogo sintético	20
	análogo sintético	20
	análogo sintético	40

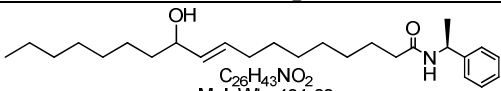
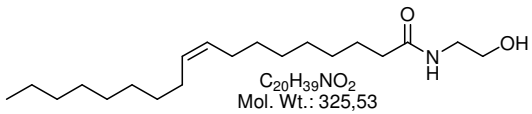
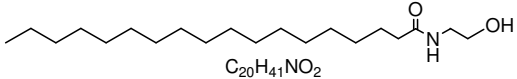
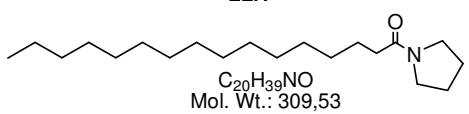
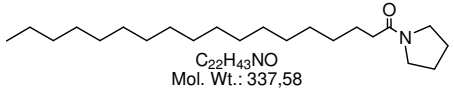
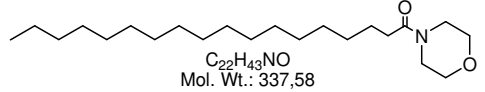
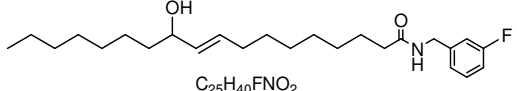
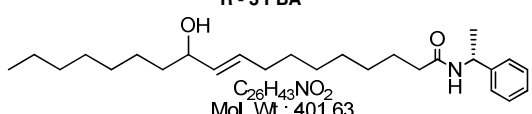
APÊNDICE D - Avaliação da atividade moluscicida em *B. glabrata* adulto de análogos da piplartina e amidas de origem sintética na concentração de 10 ppm.

(continuação)		
Estrutura química	Origem	Atividade moluscicida (%)
	análogo sintético	40
	análogo sintético	20
	análogo sintético	20
	análogo sintético	40
	análogo sintético	60
	análogo sintético	20
 $C_{23}H_{38}FNO$ Mol. Wt.: 363,55 P 3 - FBA	amida sintética	10
 $C_{23}H_{38}FNO$ Mol. Wt.: 363,55 P 4 - FBA	amida sintética	30
 $C_{25}H_{42}FNO$ Mol. Wt.: 391,61 E 2 - FBA	amida sintética	20
 $C_{25}H_{40}FNO$ Mol. Wt.: 389,59 O 2 - FBA	amida sintética	20
 $C_{25}H_{40}FNO$ Mol. Wt.: 389,59 O 3 - FBA	amida sintética	20
 $C_{25}H_{40}FNO_2$ Mol. Wt.: 405,59 R - 4 FBA	amida sintética	30

APÊNDICE D - Avaliação da atividade moluscicida em *B. glabrata* adulto de análogos da piplartina e amidas de origem sintética na concentração de 10 ppm.

(continuação)		
Estrutura química	Origem	Atividade moluscicida (%)
 $C_{23}H_{39}NO$ Mol. Wt.: 345,56 PBA	amida sintética	10
 $C_{25}H_{43}NO$ Mol. Wt.: 373,62 EBA	amida sintética	10
 $C_{25}H_{41}NO$ Mol. Wt.: 371,6 OBA	amida sintética	30
 $C_{25}H_{41}NO_2$ Mol. Wt.: 387,6 RBA	amida sintética	30
 $C_{25}H_{39}NO$ Mol. Wt.: 369,58 LBA	amida sintética	0
 $C_{24}H_{41}NO$ Mol. Wt.: 359,59 (R)PMBA	amida sintética	20
 $C_{24}H_{41}NO$ Mol. Wt.: 359,59 (S)PMBA	amida sintética	10
 $C_{26}H_{45}NO$ Mol. Wt.: 387,64 (R)EMBA	amida sintética	0
 $C_{26}H_{45}NO$ Mol. Wt.: 387,64 (S)EMBA	amida sintética	0
 $C_{26}H_{43}NO$ Mol. Wt.: 385,63 (R)OMBA	amida sintética	60
 $C_{26}H_{43}NO$ Mol. Wt.: 385,63 (S)OMBA	amida sintética	20

APÊNDICE D - Avaliação da atividade moluscicida em *B. glabrata* adulto de análogos da piplartina e amidas de origem sintética na concentração de 10 ppm. (conclusão)

Estrutura química	Origem	Atividade moluscicida (%)
 <p>$C_{26}H_{43}NO_2$ Mol. Wt.: 401,63 (S)RMBA</p>	amida sintética	10
 <p>$C_{20}H_{39}NO_2$ Mol. Wt.: 325,53 OEA</p>	amida sintética	30
 <p>$C_{20}H_{41}NO_2$ Mol. Wt.: 327,55 EEA</p>	amida sintética	40
 <p>$C_{20}H_{39}NO$ Mol. Wt.: 309,53 PPRA</p>	amida sintética	100
 <p>$C_{22}H_{43}NO$ Mol. Wt.: 337,58 EPRA</p>	amida sintética	60
 <p>$C_{22}H_{43}NO$ Mol. Wt.: 337,58 EMA</p>	amida sintética	40
 <p>$C_{25}H_{40}FNO_2$ Mol. Wt.: 405,59 R - 3 FBA</p>	amida sintética	10
 <p>$C_{26}H_{43}NO_2$ Mol. Wt.: 401,63 (R)RMBA</p>	amida sintética	20

n=10 animais

Valores obtidos após 7 dias de observação