

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**Ação do tratamento com *Mentha piperita* L. e *Harpagophytum  
procumbens* contra *Schistosoma mansoni* - *in vitro*: **Análise  
Proteômica****

RICARDO DE OLIVEIRA CORREIA

**SÃO CARLOS – SP**

**2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**Ação do tratamento com *Mentha piperita* L. e *Harpagophytum  
procumbens* contra *Schistosoma mansoni* - *in vitro*: **Análise  
Proteômica****

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Carlos, como parte das exigências  
do programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia para a obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia.

**Ricardo de Oliveira Correia**

**Orientadores:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal (DMP-UFSCar)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Débora Gusmão Melo (DMed-UFSCar)

**SÃO CARLOS – SP**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

C824at      Correia, Ricardo de Oliveira.  
Ação do tratamento com *Mentha piperita* L. e  
*Harpagophytum procumbens* contra *Schistosoma mansoni* -  
*in vitro* : análise proteômica / Ricardo de Oliveira Correia. --  
São Carlos : UFSCar, 2015.  
120 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

1. Biologia molecular. 2. Parasitologia. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Plantas. 5. *Mentha piperita*. 6. Proteômica. I. Título.

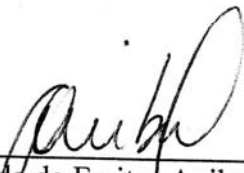
CDD: 574.88 (20<sup>a</sup>)

**Ricardo de Oliveira Correia**

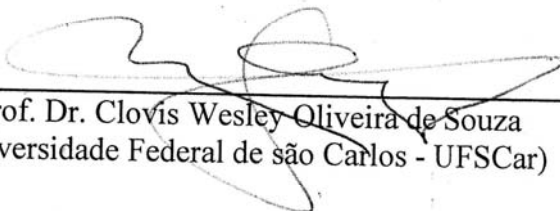
Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 08/08/2014**

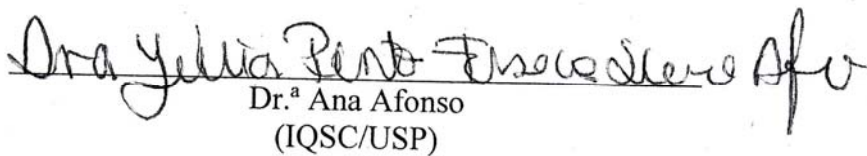
**BANCA EXAMINADORA**



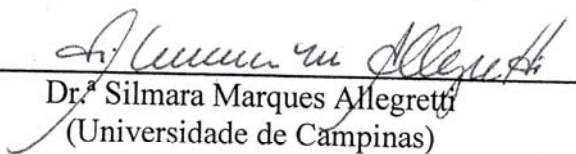
Prof.ª Dr.ª Fernanda de Freitas Anibal (Orientadora)  
(Universidade Federal de São Carlos – UFSCar)



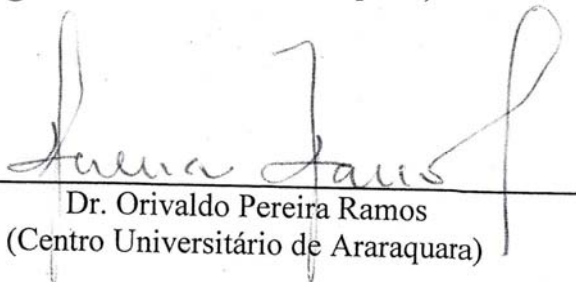
Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza  
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



Dr.ª Ana Afonso  
(IQSC/USP)



Dr.ª Silmara Marques Allegretti  
(Universidade de Campinas)



Dr. Orivaldo Pereira Ramos  
(Centro Universitário de Araraquara)

**Dedico aos meus pais**  
**Rubens L. Correia Filho e**  
**Maria de Fátima J. de Oliveira Correia.**

“O único lugar em que o sucesso  
vem antes do trabalho é no dicionário”

*Albert Einstein*

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que por sua presença, sempre me capacitou e me iluminou por toda a minha vida.

Aos meus pais Rubens e Maria de Fátima, que sempre me apoiaram e que sempre se esforçaram para me proporcionar o melhor possível. Por eles sempre terei toda minha admiração, respeito e amor.

Ao meu irmão Rodrigo o qual sempre foi companheiro o qual sempre pude confiar e contar com total apoio. Também a toda minha família que mesmo longe sempre me apoiaram.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, por qual tenho muito respeito e admiração, pelo respeito, carinho, apoio, por toda dedicação e pela confiança para realização deste projeto. Agradeço por toda a ajuda e amizade dentro e fora do laboratório.

À Dra. Ana Afonso, Universidade Nova de Lisboa, que tenho muita admiração. Agradeço por toda dedicação e discussão de estudos e pela amizade. Apesar de ter chegado há pouco tempo no laboratório é uma pessoa que muito me ajudou neste projeto.

À prof<sup>ª</sup>. Dra. Débora Gusmão Melo por também ter aceitado ser minha orientadora e por todo apoio.

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia da UFSCar, Joice, Débora, Sandra, Naiara, Laís, pela ajuda nos experimentos, pela ajuda em estudos e discussão.

Agradeço a toda equipe do grupo BioMics, em especial ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, Jenifer, Adriano, Sheila, Juliana Alberice, Patricia, pela discussão e ajuda da padronização de protocolos.

Agradeço a equipe do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, principalmente ao Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues pela ajuda nas ajudas nos protocolos e na execução de experimentos e a técnica Olinda Mara pela ajuda nas infecções.

À equipe do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Franca, principalmente a Dra. Lizandra G. Magalhães pela ajuda nos protocolos e na execução de experimentos.

À equipe do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materias (CNPEM), onde foi realizado parte do experimento com.

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Prof. Dr. Paulo Cesar Vieira e o Prof. Dr. Jame's Almada da Silva pela ajuda na elaboração dos extratos das plantas.

Ao Prof. Dr. Luiz Vitor Sacramento, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, pelo fornecimento de plantas e extratos para este estudo.

Agradeço a todos meus amigos pelo apoio, palavras incentivo, além de momentos de descontração e diversão.

À FAPESP, processo 2012/08542-4, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim agradeço a todos que ajudaram de alguma forma para este projeto e esta conquista.



## Resumo

A esquistossomose mansônica, doença que afeta mais de 240 milhões de pessoas no mundo é causada por um trematódeo, o *Schistosoma mansoni*. Entre as doenças tropicais, ocupa o segundo lugar em mortalidade no mundo, perdendo apenas para a malária. A presença de cepas com perda de sensibilidade ao tratamento com o fármaco comercial disponível (Praziquantel) sugere a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta doença. O uso de compostos naturais é uma área de grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos. A *Mentha piperita* L. conhecida popularmente como hortelã pimenta, tem seus efeitos terapêuticos comprovados no tratamento de algumas parasitoses (como giardíase). Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram diminuição do processo inflamatório no modelo murino da esquistossomose, quando os animais foram tratados com extrato da *M. piperita*. No entanto, nada se sabe sobre a ação da *M. piperita* no parasito. E a planta, nativa da África, *Harpagophytum procumbens* apresenta eficácia contra bactérias e doenças reumáticas, mas nada foi descrito contra a esquistossomose. Dessa forma, propomos a avaliação do efeito do extrato etanólico e suas diferentes partições da *Mentha piperita* e o extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* em vermes adultos de *S. mansoni*, observando efeito por microscopia óptica e a ocorrência de alterações no perfil da expressão proteica, após o tratamento *in vitro*. As análises por microscopia revelou que, todos os extratos testados induziram separação dos casais e redução da atividade motora. E exceção foi observada com a partição hidroalcoólica da *M. piperita*, onde todos os vermes adultos de *S. mansoni* estavam mortos, após exposição. O extrato da *H. procumbens* provocou mortes dos vermes adultos, com menor concentração, comparado ao extrato da *M. piperita*. E entre os extratos com a *M. piperita* foi observado que, a partição com o acetato de etila apresentou resultados mais promissores no controle dos parasitas. Na análise proteômica, todos os tratamentos revelaram *spots* diferentes em géis de eletroforese bidimensionais após análises por *software*. Posteriormente, as proteínas presentes nos *spots* foram reveladas, e utilizando a espectrometria de massas identificadas proteínas que se apresentam como importantes para homeostase celular do *S. mansoni* e podem ser consideradas como possíveis alvos para vacinas, como actina, enolase, Frutose-bifosfato aldolase, entre outras. Nossos resultados sugerem que, estas plantas podem apresentar efeito antihelmintico contra *S. mansoni*. Por tanto é preciso mais estudos para melhores entendimentos dos efeitos dos extratos destas plantas nesse modelo.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*; Proteômica; *Mentha piperita* L.; *Harpagophytum procumbens*.

## Abstract

Mansonic schistosomiasis is a disease that infected more than 240 million people worldwide, it is caused by *Schistosoma mansoni*. It is the second only to malaria in public health importance. The only drug currently effective against *S. mansoni* is Praziquantel (PQZ), however, has been reported strains of *S. mansoni* with loss of sensitivity. Such reports reinforce the need to develop new safer treatment against *S. mansoni*. The natural compounds are important to develop new drugs. *Mentha piperita* L. also known as peppermint, studies reported the treatment as antiparasitic diseases (for example giardiasis). In our laboratory showed a decrease of inflammatory process of schistosomiasis in a murine model after treatment with ethanolic extract of *M. piperita*. However don't know nothing about action of this plant against adult worms of *S. mansoni*. *Harpagophytum procumbens* is a plant that has origins in Africa, studies showed promising results antibacterial and against rheumatism diseases, but has no studies against schistosomiasis. In this study we evaluated effect of ethanolic extract of *H. procumbens* and ethanolic extract of *Mentha piperita* L. and its fractions against *Schistosoma mansoni*, its observed for optical microscopic and change in protein expression, after *in vitro* assay. It was observed that all extract and its fraction caused the motor activity reduction and separation of couple worms. Exceptions of hydroalcoholic fraction of *M. piperita*, *S. mansoni* adult worms were death after treatment. We observed that ethanolic extract of *H. procumbens* showed more promising results when compared with *M. piperita*. And we observed that ethyl acetate shoed more promising result than ethanolic extract of *M. piperita* and its other fractions. In this work was observed change in protein expression in 2D gel electrophoresis after all ethanolic extractions and fractions treatment. The proteins in gel electrophoresis have been identified by mass spectrometry. The mass spectrometry assay showed important proteins for *S. mansoni* homeostasis and possible therapeutic target, for example actin, enolasis, fructose-biphosphate aldolase, and others important proteins. These results indicate that these plants may be anthelmintic activity against *S. mansoni*. However, it has need for more studies to complete undesiring of these extract against *S. mansoni*.

Keyword: *Schistosoma mansoni*, Proteomic, *Mentha piperita* L., *Harpagophytum procumbens*.

## Sumário

1 – Introdução .....	19
1.1 – Esquistossomose .....	19
1.2- <i>Schistosoma mansoni</i> .....	21
1.3 - Tratamentos na esquistossomose .....	23
1.4 Plantas .....	25
1.4.1 – <i>Mentha piperita</i> L. ....	26
1.4.2 – <i>Harpagophytum procumbens</i> .....	27
1.5 - Proteoma .....	28
1.5.1 – Eletroforese Bidimensional .....	29
1.5.2 – Espectrometria de massa (MAS) .....	31
2- Objetivos .....	33
3–Material e Métodos.....	34
3.1 – Animais .....	34
3.2 - Obtenção das larvas infectantes do <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa LE) .	34
3.3 - Infecções dos camundongos com as larvas infectantes (cercárias) do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	34
3.4 - Recuperação de ovos e dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	35
3.5 – Obtenção dos extratos etanólicos da <i>Mentha piperita</i> L.e da <i>Harpagophytum procumbens</i> .....	35
3.6 - Fracionamento do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> L. ....	36
3.7 - Cultura do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	37
3.8 - Extração das proteínas totais do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	39
3.8.1 - Determinação da Concentração de Proteínas .....	40
3.9 - Eletroforese bidimensional.....	40
3.9.1 - Focalização Isoelétrica .....	40
3.9.2 - SDS-PAGE .....	42
3.9.3 - Detecção das proteínas nos géis .....	42
3.9.4 - Digestão dos géis .....	43
3.10 - Espectrometria de massa .....	44
3.10.1 - Preparação da amostra para a espectrometria de massa .....	44
3.10.2 - Ionização por Electrospray .....	44
3.10.3–Analisadores de massas .....	45

3.10.4 – Processamento dos dados após a identificação das cadeias peptídicas .....	46
4 – Resultados .....	48
4.1 - Efeito do extrato etanólico de <i>Mentha piperita</i> L. sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i> mantidos <i>in vitro</i> .....	48
4.2 - Efeito do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> L. sobre a mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	51
4.3- Efeito da <i>Mentha piperita</i> sobre a oviposição e desenvolvimento dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	52
4.4 - Efeito das partições do extrato de <i>Mentha piperita</i> L. no pareamento, sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> mantidos <i>in vitro</i> .....	54
4.5 - Efeito do extrato etanólico de <i>Hapagophytum procumbens</i> sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i> mantidos <i>in vitro</i> .....	61
4.6–Eletroforese em Gel SDS (1D).....	64
4.7 - Eletroforese Bidimensional .....	65
4.7.1 – Eletroforese Bidimensional com extratos etanólicos da <i>Mentha piperita</i> L. e da <i>Hapagophytum procumbens</i> .....	65
4.7.2 – Eletroforese Bidimensional com partições FA e FH da <i>Mentha piperita</i> L.....	70
4.8 - Análises das proteínas por espectrometria de massas.....	79
4.8.1 – Análises das proteínas presentes nos spots dos géis com amostras após o tratamento dos extratos etanólicos da <i>Mentha piperita</i> L.....	79
4.8.2 – Identificação das proteínas presentes nos spots dos géis com tratamento com partição de acetato de etila (FA), partição de hexano (FH) e partição hidro alcoólica (FHA) do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> L. ....	82
Antígeno Sm21.7.....	89
Antígeno Sm21.7.....	89
4.8.3 – Identificação das proteínas presentes nos spots dos géis com tratamento com partição do extrato etanólico da <i>Hargophytum procumben</i> .....	95
5. Discussão.....	98
6 – Conclusão .....	105
7 –Bibliografia.....	106
8 –Anexos .....	120

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Foto representativa da cultura do grupo controle de *Schistosoma mansoni* aumento de 100x. O casal se manteve acoplado. .... 49
- Figura 2: Foto representativa da cultura de *Schistosoma mansoni* com tratamento de 1000µg/mL da *Mentha piperita* L. aumento de 40x. Sendo demonstrada a separação do casal de parasito nesta concentração, e os vermes mortos..... 49
- Figura 3: Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. na mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*: sendo avaliados nas concentrações de 500, 1000, 1500, 2000, 2500µg/mL, no período de 24 e 120 horas. O teste de viabilidade foi feito utilizando o método de MTT com filtro de leitura em 550nm \*p<0.0001. .... 51
- Figura 4: Efeito da *Mentha piperita* L. sobre a ovoposição e no desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*: A- Ovoposição, Os números de ovos foram analisados apenas na concentração de 500µg/mL, por 120 horas, por ser uma concentração que não causou morte e nem separação dos casais. B – Análise quantitativa do desenvolvimento dos ovos \*p<0.001. Foram analisados com diferentes concentrações do extrato por 120 horas. .... 52
- Figura 5: Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* em ovos de *S. mansoni*. Grupo controle com 0,1% de DMSO (A) e nas concentrações de 500µg/mL (B), 1000 µg/mL (C), 1500 µg/mL (D), 2000 µg/mL (E) e em 2500 µg/mL (F) do extrato etanólico da *M.piperita*. A seta na cor preta representa ovos viáveis e a seta na cor branca representa ovos inviáveis. .... 53
- Figura 6: Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. e das partições na mortalidade do *Schistosoma mansoni*: Comparando os resultados obtidos nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml após 24h..... 60
- Figura 7: Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. e da *H. procumbens* na mortalidade de *Schistosoma mansoni*: Comparando os resultados obtidos nas concentrações de 1000 e 1500 µg/ml após 24h..... 62
- Figura 8: Gel da Eletroforese SDS-PAGE (1D) utilizado para verificar a qualidade da extração das proteínas de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após os tratamentos: 1- Controle, 2 e 3– Extrato Etanólico da *M. piperita*, 4- Partição com Acetato de Etila, 5- Partição com Hexano, 6- Partição Hidro Alcoólica e 7 – Extrato Etanólica da *H. procumbens*. .... 64
- Figura 9: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da planta *M.piperita* sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado

com os géis do grupo controle analisados com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare)..... 66

Figura 10: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 67

Figura 11: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml do extrato etanólico da planta *H. procumbens*, sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 68

Figura 12: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com extrato etanólico da *H. procumbens* analisado com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 69

Figura 13: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml com a partição FA do extrato etanólico da planta *M. piperita* sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 71

Figura 14: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FA do extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 72

Figura 15: Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml com a partição FH do extrato etanólico da planta *M. piperita* sendo observados *spots* com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). ..... 74

Figura 16:Gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> , grupo Controle, sendo observados <i>spots</i> com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FH do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> analisado com o <i>softwareImageMaster Platinum 2D 7</i> (GE healthcare). .....	75
Figura 17:Gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> ,com tratamento de 500 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da planta <i>M. piperita</i> sendo observados <i>spots</i> com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o <i>softwareImageMaster Platinum 2D 7</i> (GE healthcare). .....	77
Figura 18:Gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> , grupo Controle, sendo observados <i>spots</i> com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FAH do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> analisado com o <i>softwareImageMaster Platinum 2D 7</i> (GE healthcare). .....	78
Figura 19: <i>Spots</i> identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> com o tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> ,spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap. ....	81
Figura 20: <i>Spots</i> identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> grupo Controle comparado com tratamento da partição FA do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> ,spots identificados por espectrometria de massas qTOF. ....	85
Figura 21: <i>Spots</i> identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> com o tratamento de 500 µg/ml da partição FA extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> ,spots identificados por espectrometria de massas qTOF. ....	87
Figura 22: <i>Spots</i> identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> grupo Controle comparado com tratamento da partição FH do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> ,spots identificados por espectrometria de massas qTOF. ....	90
Figura 23: <i>Spots</i> identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de <i>Schistosoma mansoni</i> com o tratamento de 500 µg/ml as partição FH do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> ,spots identificados por espectrometria de massas qTOF. ....	90

Figura 24: *Spots* identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 1000 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap. .... 94

Figura 25: *Spots* identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 500 µg/ml do extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens*, spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap.. .... 97



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do coquetel Inibidor de Protease na concentração de 10X. Foi dissolvido na concentração de 1X somente na hora do uso, as substâncias foram dissolvidas em etanol 100%, foi utilizado 10µL de coquetel inibidor para cada 1mL de amostra. O PMSF foi adicionado na hora do uso...	39
<b>Tabela 2:</b> Procedimento para coloração do Gel–SDS, utilizando o método de revelação de proteínas no gel SDS. ....	43
Tabela 3: Efeito do extrato etanólico da <i>Mentha piperita</i> L., em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> , no período de 24 e 120 horas de tratamento. ....	50
Tabela 4: Efeito da partição com Acetato de etila do extrato da <i>M.piperita</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> . Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.....	55
Tabela 5: Efeito da partição com Hexano do extrato da <i>M.piperita</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosomamansoni</i> . Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.....	57
Tabela 6: Efeito da partição Hidroalcoólica do extrato da <i>M. piperita</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> . Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.....	59
Tabela 7: Efeito do extrato etanólico da <i>H. procumbens</i> sobre vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> . Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.....	63
Tabela 8: Proteínas do <i>S. mansoni</i> identificadas dos spots no gel com tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> . ....	80
Tabela 9: Proteínas do <i>S. mansoni</i> identificadas no gel controle, comparada com tratamento com 500 µg/ml da partição FA do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> .....	84
Tabela 10: Proteínas do <i>S. mansoni</i> identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml da partição FA do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> .....	86
Tabela 11: Proteínas do <i>S. mansoni</i> identificadas no gel controle, comparadas com tratamento com 500 µg/ml da partição FH do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> .....	89
Tabela 12: Proteínas do <i>S. mansoni</i> identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml da partição FH do extrato etanólico da <i>M. piperita</i> .....	91

Tabela 13: Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 1000 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da *M. piperita*. ..... 93

Tabela 14: Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml do extrato etanólico da *H procumbens*..... 96

## LISTA DE ABREVEATURAS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

BSA – Bovine sérum albumin

Dissulfeto isomerase proteínica – Precursora (erp60)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditotreitól

Eletroforese 2-D – Eletroforese bidimensional

ESI – Ionização por electrospray (*Electrospray Ionization*)

FA – partição Fracionado com acetato de etila

FH – partição Fracionado com Hexano

FHA - partição Fracionada com hidroalcoólica

FTICR - Analisador de massa ressonância ciclôtrônica de íons – (*Fourier transform ion cyclotron resonance*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- (*High Performance Liquid Chromatography*)

IAA – Iodoacetamina

IEF – Focalização Isoelétrica (*Isoelectric Focusing*)

IL-10 – Interleucina-10

IPG – Gradiente de pH Imobilizado (*Immobilized pH Gradient*)

IT – *Analisador de massa iontrap*

m/z – relação entre carga e massa

MAS – Espectrometria de Massa

mg – Miligrama

ml – Mililitro

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OT – Analisador de massa Orbitrap

pI – Ponto isoelétrico

PMSF – Fenilmetilsulfonilflúor

PZQ – Praziquantel

Q – Analisador de massa Quadripolo

qTOF – Analisador quadrupolo tempo de voo (*Quadropole Time of Fligth*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel*)

SPF – *Specific Pathogen Free*

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa (*Tumor Necrose Factor – Alpha*)

TOF – Analisador de massa tempo de voo (*Time Of Flight*)

UniProt/Swiss Prot (*Universal Protein Resource*)

## 1 – Introdução

### 1.1 – Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença infecciosa, causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma* (REY, 2008; STAVITSKY, 2004). No Brasil, esta doença é conhecida popularmente como “xistose”, “mal-do-caramujo” ou “barriga-d’água”, devido à ascite que acompanha nas formas mais grave da doença, com presença de fibrose hepática (NEVES, 2005; REY, 2008). Alguns autores acreditam que a espécie do gênero *Schistosoma* provavelmente chegaram às Américas durante o tráfico de escravos e por migração, nos quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*) e *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) e *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) (TCHUENTÉ *et al* 1995; KATZ; ALMEIDA 2003). No entanto, apenas o *S. mansoni* conseguiu se adaptar ao ecossistema do Brasil, por ter encontrado seus hospedeiros intermediários (*Biophalaria* sp) e pelas condições ambientais semelhantes às regiões de origem do parasito (NEVES, 2005). No Brasil é endêmico sete das 10 espécies de caramujo de *Biophalaria*, sendo que em geral o *Biophalaria glabrata* (*B. glabrata*) é a espécie dominante e o principal vetor de *S.mansoni* nas Américas (KLOOS *et al*, 2004). O habitat natural destes caramujos são pequenos afluentes, pântanos e lagos, porém é encontrado grande numero de *B. glagrata* em canais de irrigação, mostrando ser um importante habitat para esta espécie e para transmissão para *S. mansoni* (PESSOA; MARTINS, 1988; KLOSS *et al*, 2001)

A elevada frequência da esquistossomose, déficit orgânico, invalidez e até óbitos precoces, causado pela esquistossomose, compromete o desenvolvimento de jovens e a produtividade da população adulta, podendo assim ocasionar consequências na economia domestica e para o desenvolvimento socioeconômico de regiões afetadas (REY, 2008; WHO, 2014). Essa abordagem traz uma preocupação sobre o efeito em longo prazo e estratégias de compensação por indivíduos e famílias (BRUUN; AAGAARD-

HANSEN, 2008). A infecção em humano pelo *S. mansoni* pode provocar alterações anatomopatológicas, onde cerca de 4 a 5% dos pacientes apresentam lesões hepatoesplênicas graves (VAN DER WERF *et al*, 2003; REY, 2008). No hospedeiro humano, a doença é caracterizada pela presença de granuloma hepático, resultado de um grande infiltrado celular e fibrose tecidual, tendo o primeiro caso clínico descrito em 1847 por Fuji (KATZ; ALMEIDA, 2003). Dessa forma, a relação parasito-hospedeiro pode levar a hepatoesplenomegalia, fibrose hepática, ascite e hipertensão portal, causando a morte de cerca de 130.000 pessoas anualmente na África e aproximadamente 300 milhões de indivíduos infectados ao redor do mundo (LAMMIE; FENWICK; UTZINGER, 2006; STEINMANN *et al.*, 2006; VAN DER WERF *et al*, 2003; WHO, 2014).

O homem, ao fazer modificações no meio ambiente, fornece à doença um novo habitat, como exemplo, a construção de represas e obras de irrigação. Devido ao ciclo biológico do parasito as áreas de irrigação são importantes áreas de transmissão da esquistossomose (COUTINHO; SILVA; GOLÇALVES, 1992). Mesmo com o processo de urbanização permitiu novos habitats para a doença, como nas periferias, sem infraestrutura de saneamento básico e tendo regular processo migratório de pessoas de áreas endêmicas (GUIMARÃES; TAVARES-NETO, 2006).

Esquistossomose é endêmica em 78 países e afeta mais de 250 milhões de indivíduos no mundo, sendo que aproximadamente 100 milhões são africanos. É estimado que 700 milhões de pessoas em todo o mundo correm o risco de adquirir esta infecção devido às atividades agrícolas, doméstica e de lazer que pode expô-los a água contaminada (WHO, 2014). Do total de pessoas infectadas, aproximadamente 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões apresentam a forma grave da infecção (REY, 2008; POSTIGO, 2008). A esquistossomose representa um dos maiores problemas de saúde no mundo, ocupando o segundo lugar entre as doenças parasitárias tropicais mais comuns, perdendo apenas para malária. (REY, 2008; WHO, 2014). Apesar dos esforços persistentes, ainda não existem vacinas disponíveis (ABDUL-GHANI *et al*, 2009). Mais de 25 milhões de brasileiros vivem em áreas endêmicas e 2.5 milhões apresentam sintomas da doença (CARVALHO; JANNOTTI-PASSOS;

CALDEIRA, 2008). Segundo WHO (2014) no Brasil em 2010 houve mais de 6 milhões de indivíduos infectados.

## 1.2- *Schistosoma mansoni*

Historicamente, Bilharz em 1852 descreveu um parasito intravascular durante uma necropsia, ao qual deu o nome de *Distomum haematobium*. Posteriormente, Weinland em 1858 denominou o gênero deste helminto de *Schistosoma*, uma vez que o macho apresenta o corpo fendido (schito=fenda; soma=corpo) (REY, 2008; NEVES, 2005).

O *Schistosoma mansoni* é um organismo complexo. Aspectos genéticos e bioquímicos deste parasito interessam para a investigação de novas vacinas e novos farmacos, mas também podem fornecer informações sobre a biologia do verme (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al*, 2003). Durante o seu desenvolvimento, o *S. mansoni* é exposto a diferentes microambientes, sofre modificações morfológicas e transformações fisiológicas, como resultados da mudança na expressão de alguns genes. Ao contrário dos nematoides, que são protegidos por uma cutícula, o *S. mansoni* é coberto por uma camada viva de sincício, denominada de tegumento (SILVANEVES; GOMES, 2008; REY, 2008). O tegumento contém proteínas que atuam como barreira, fornecendo proteção para a membrana plasmática do parasito contra o ataque da imunidade do hospedeiro (ABATH; WERKHAUSER, 1996; VAN HELLEMOND *et al*. 2006). O corpo celular nucleado do *S. mansoni* se localiza abaixo do tegumento e é conectado ao mesmo por micro túbulos citoplasmáticos alinhados, sendo o aparelho digestório incompleto (BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006).

O tegumento do *S. mansoni* tem capacidade de sequestrar algumas proteínas do hospedeiro por mecanismo passivo, incorporando-as. Assim, o parasito pode passar despercebido pelo sistema imune do hospedeiro (BRASCHI; WILSON, 2006). As proteínas identificadas do *S. mansoni* podem ser categorizadas em três classes: (1) somente do tegumento, (2) somente da parte interna do parasito (sem o tegumento) e (3) comum para o tegumento e

para o restante do parasito, o total de 222 proteínas foi encontrado no tegumento (BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006). A caracterização das proteínas específicas do tegumento tem interesse especial, porque essas proteínas são as primeiras a serem apresentadas ao sistema imune do hospedeiro, podendo ser alvos de estudos para desenvolvimentos de novos tratamentos (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al*, 2003).

O *Schistosoma mansoni* tem um ciclo de vida heteroxênico, que possui como hospedeiro intermediário caramujo de água doce (o gênero *Biomphalaria*) e como hospedeiro definitivo o mamífero, podendo ser representado pelo humano, onde ocorre a fase sexuada de reprodução (KATZ; ALMEIDA, 2003; REY, 2008).

A forma adulta do verme habita preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, onde as fêmeas põem seus ovos no nível da submucosa, os quais atravessam as paredes dos vasos, na lâmina própria, e atingem o lúmen. (STAVITSKY, 2004; REY, 2008). Cada fêmea põem cerca de 300 a 400 ovos por dias, na parede de capilares e vênula, porém apenas uma media de 50% desses ovos ganham o meio externo (NEVES, 2005; BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008). Os ovos são excretados junto às fezes, entretanto, alguns ficam retidos nos tecidos ou no sistema porta alojando-se nos sinusóides e induzindo a formação de granuloma hepático e de hipertensão portal (STAVITSKY, 2004; WHEATER; WILSON, 1979; DEJANI *et al*, 2014). Os ovos ao entrar em contato com a água eclodem o miracídio, liberando os miracídios, este fica nadando em círculos até encontrar moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiro intermediário) (STAVITSKY, 2004; REY, 2008). No hospedeiro intermediário, o miracídios se desenvolve em esporocistos, onde se tem gerações de células germinativas, e posteriormente, estas células germinativas transformam-se em cercarias que deixam o hospedeiro intermediário em busca de um definitivo, cada miracídio pode gerar por volta de 1000 a 3000mil cercarias dependendo da espécie (NEVES, 2005; REY, 2008). A cercária, penetra na pele do mamífero, transformando-se em esquistossômulos, e migra para a circulação venosa, ao ganhar a circulação vai até o coração, depois para os pulmões e em seguida para o fígado, onde o parasito atinge a maturidade (KATZ;



ALMEIDA, 2003; REY, 2008). Para a formação completa do ciclo no hospedeiro definitivo e novamente a liberação de ovos, ocorre em um período de 10 semanas, em condições ideais de temperatura (cerca de 28° C), o casal de verme adulto pode manter em média a postura de ovos por 2 a 5 anos (NEVES, 2005, BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008).

### **1.3 - Tratamentos na esquistossomose**

Dentre os medicamentos utilizados para tratar a esquistossomose mansônica está o Praziquantel (PZQ) e o Oxamniquine (REY, 2008). O Oxamniquine foi utilizado extensamente para tratamento em massa da esquistossomose (KATZ,1980), entretanto apresenta efeitos colaterais indesejáveis, principalmente no sistema nervoso central e favorece o desenvolvimento de efeitos mutagênicos (MACHADO, 1982; BARBERATO, 1996). Além de ter sido observada linhagens humanas do parasito resistentes a este ao tratamento (DIAS *et al*, 1978). Por estes motivos, e por apresentar efeitos apenas na espécie *mansoni*, este medicamento não faz parte das opções terapêuticas atuais para tratar a esquistossomose, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

O PZQ é o farmaco de referencia e recomendada pela OMS para o tratamento da esquistossomose. Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas é sabido que o fármaco é absorvido pelo verme adulto por difusão simples, aumentando a permeabilidade da membrana celular ao cálcio o que gera efeitos primários como contrações tetânicas, seguidas de paralisia da musculatura. A ação do PZQ acontece logo após o contado com o verme adulto, provocando alterações do fluxo de cálcio no tegumento (CAMPBELL; REW, 1986; DAVIS, 1993; CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 1995; BLANCHARD, 2004; TALLIMA; RIDI, 2007). Em poucos minutos é possível observação da contração na musculatura do verme, nos testes *in vitro* (TALLIMA; RIDI 2007). Em etapa posterior, observa-se vacuolização e alterações do tegumento o que causa a morte do parasito (CAMPBELL; REW, 1986). Também pode ser observadas deformações no tegumento logo após a exposição do verme ao farmaco. Os machos apresentam vacuolização e bolhas no tegumento,

enquanto as fêmeas são afetadas nas camadas subsegmentares (MELHORN, *et al*, 1981).

PZQ é ativo contra esquistossômulos nos dois primeiros dias após a infecção. Porém, durante as quatro semanas seguintes o parasito permanece não susceptível ao fármaco (período refratário), voltando a responder ao tratamento apenas quando o verme atinge sua fase adulta. Isto se deve às diferentes composições do tegumento do verme, durante seus estágios de desenvolvimento dentro do hospedeiro definitivo (HAGAN *et al*, 2004). Os efeitos colaterais do PZQ incluem: aumento da temperatura corporal, convulsão, desconforto abdominal, diarreia, cefaleia, mal estar, náusea, perda do apetite, sonolência, sudorese, lipotimia e vômitos (BARBERATO, 1996).

Apesar deste tratamento ser eficaz, existe aparecimento de linhagens de *S. mansoni* com perda significativa da sensibilidade ao PZQ (CAPRON, 1998; BERGQUIST, 1998; WILLIAN *et al*, 2001), provavelmente por causa de alteração na expressão da enzima citocromo-c oxidase do verme, quando ocorre esta alteração, os danos nos vermes adultos são menores (FALLON; DOENHOFF, 1994; PEREIRA; FALLON; CORNETTE, 1998; DAY; BENNET; PAX, 1992; WILLIAM *et al.*, 2001). Estudos realizados no Egito e Senegal demonstram a persistência de eliminação dos ovos em pacientes tratados com PZQ (CIOLI, 1998), sugerindo nesta região o desenvolvimento de cepas resistentes. Geralmente tratamento da esquistossomose com Praziquantel, em zona de epidemiológicas, resulta em taxas de cura de 70 a 90%, e redução das taxas da contagem de ovos nas fezes (GRYSEELS; NKULIKYINKA; COOSEMANS, 1987; DAVIS, 1993; KUMAR; GRYSEELS, 2007). Porém, estudos no Senegal, após um surto de esquistossomose em 1991, demonstrou que, depois do tratamento padrão com Praziquantel, a taxa de cura 12 semanas (conforme a linhagem) após o tratamento foi de apenas 18% e redução de 86% da taxa intensidade da infecção (STELMA *et al*, 1995; GRYSEELS *et al*, 2001)

O tratamento por Praziquantel é dependente do estado imune do hospedeiro (BRINDLEY; SHER, 1987; RIBEIRO *et al*, 2004), estudos em camundongos deficientes de células T, demonstrou que a eficácia do farmaco é menor que

em camundongos sem a participação celular (SABAH *et al*, 1985). Devido ao fato de que o praziquantel ser o único fármaco no momento contra o *S. mansoni* e surgimento de cepas com perda de sensibilidade ao tratamento e com a alta incidência da esquistossomose em nosso país, surge à necessidade de desenvolvimento de fármacos mais eficaz para combater a esquistossomose (BARBERATO, 1996; CAPRON, 1998; WILLIAN *et al*, 2001).

## 1.4 Plantas

O uso de plantas medicinais é uma prática secular, baseada no conhecimento popular (NASCIMENTO *et al*, 2000; CASTRO *et al*, 2000). E os conhecimentos sobre seus possíveis efeitos terapêuticos são transmitidos ao longo das gerações. Fundamentos farmacológicos que justificam o uso popular de plantas com a finalidade de obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos (desde antimicrobianos e vermífugos, até anti-hipertensivos e hipoglicemiantes) têm sido descritos há décadas (CASTRO *et al*, 2000; BURT, 2004), partindo do conhecimento popular, foi possível a descoberta de alguns medicamentos utilizados na medicina tradicional como salicilatos e digitálicos (BOTSARIS; MACHADO,1999). Numa população onde a grande maioria depende do sistema público de saúde, como o Brasil, agregar garantias científicas a essa prática terapêutica traz variadas vantagens, como: baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos e a possibilidade de evitar ou diminuir os riscos de intoxicação por uso inadequado de plantas medicinais (FURLAN, 1998). Cerca de 80% da população mundial utiliza medicamentos naturais ou tradicionais para tratamento de diversas doenças, sendo a maioria com uso de extratos de plantas ou soluções aquosas (ZHANG, 2002).

Neste sentido, a investigação de compostos naturais como fontes de novos agentes terapêuticos têm aumentado potencialmente na última década. Diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido testados como possíveis biofármacos (NASCIMENTO *et al*, 2000; CASTRO *et al*, 2000). Dessa forma, neste estudo avaliamos os efeitos causados pelos extratos da planta *Mentha piperita* L. e *Harpagophytum procumbens* nos vermes adultos e ovos de *Schistosoma mansoni* *in vitro*.

### 1.4.1 – *Mentha piperita* L.

A *Mentha piperita* L., conhecida como hortelã pimenta, planta que tem origem na Europa e no Oriente Médio está bem adaptada e difundida na cultura brasileira (LORENZI; MATOS, 2002). Seu óleo essencial extraídos das folhas secas é muito utilizado para produtos farmacêuticos, perfumes e para alimentos (LORENZI; MATOS, 2002; MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Esta planta cresce, particularmente bem, em solo com grande capacidade de retenção de água, é mais conhecida por suas propriedades aromatizantes (MCKAY; BLUMBERG, 2006). *M.piperita* é uma das ervas mais utilizadas popularmente para chás, utilizada popularmente para distúrbios biliares, dispepsia, enterite, gastrite, cólicas intestinais, espasmos do ducto biliar, entre outras praticas impiricas (MCKAY; BLUMBERG, 2006). A concentração de óleo essencial nas folhas frescas desta planta é de 1,2 a 3,9 %, enquanto que foram relatados 21% (25mg/L) de óleo essencial em infusão de folhas secas (BLUMENTHAL *et al*, 1998). As concentrações de componentes pode se variar de acordo com o método e extração, ou seja, as proporções de componentes encontrados no óleo essencial da planta pode ser maior ou menor do que as proporções de componentes encontrados no chá (DUBAND *et al.*, 1992).

Os principais componentes do óleo essencial são mentol, mentona, isomentona, eucaliptol, acetato de mentila, mentofurano, limoneno, b- mirceno, b-carriofileno, pulegona e carvona (CLARK; MENARY, 1981; PITTLE; ERNST, 1998; DIMANDJA *et al*, 2000; GHERMAN; CULEA; COZAR, 2000, INOUE *et al*, 2002). O conteúdo de polifenóis foram descritos em aproximadamente 19 a 23% (12% de flavonoides totais), eioctrina e ácidos rosmarínocos entre 59 a 67%, de 7 a 12% de luteolina 7-O-rutinisida, de 6 a 10% hesperidina e poucas quantidade de 5,6-dihidroxi-7,8,3',4'- tetramethoxiflanona, pebrellina, gardenina B e apigenina (HOFFMANN; LUNDER, 1984; SAMEJIMA *et al.*, 1995; AREIAS *et al.*, 2001; ZHENG; WAMG, 2001). Também foi descrito os minerais nas folhas secas, sendo em maior concentração (g/Kg) K (33), Ca (15.3), Mg (5.8), em poucas concentrações Na e em menos concentração

(mg/Kg) são Mn (188), Zn (51) e Cu (12) e são encontrados também vestígios de Cr, I, Se (ZIMNA; PIEKOS, 1988; LOZAK *et al*, 2002).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que, a *Mentha piperita* L. possui significantes efeitos antioxidante, antitumoral, antialérgico, antiviral, antibacteriano, fungicida e antimicrobiano (MCKAY; BLUMBERG, 2006). Extrato aquoso da *M.piperita* teve significante efeito antiviral para Influenza A, vírus do Herpes (HSV) e vírus de *Newcastle* (VDN) (HERRMANN; KUCERA, 1967). Pattnaik, SUBRAMANYAM e KOLE (1996), mostrou em seus experimentos a atividade fungicida da planta contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* entre outros. De acordo com Vidal e colaboradores em 2007, extrato etanólico da *M.piperita* reduziu a viabilidade e modificou a morfologia da *Giardia lamblia in vitro*.

#### 1.4.2 – *Harpagophytum procumbens*

*Harpagophytum procumbens* (*H. procumbens*) é originária do deserto de Kalahar, da Namíbia e da África do Sul (BRIEN *et al*, 2006). Durante séculos, esta planta tem sido usada como tratamento de variadas doenças como febre, afecções cutâneas, artrite e doenças trato digestivo (GRANT *et al*, 2007). *H. procumbens* é uma planta herbácea com o nome popular de garra-do-diabo, nome dado em função do aspecto ramoso e lenhoso do fruto, provido de barbas semelhantes a garras (ANAUATE, 2007). Nos extratos secos de raízes secundárias desta planta o constituinte químico encontrado maior concentração são os iridóides, totalizando em torno de 3% do total da planta (CASTRO *et al*, 2003). Outros constituintes da planta incluem carboidratos, flavonoides, ácidos aromáticos, fitoesteróis, derivados de 2-phenil-etil e harpagoquinona e harpagosideo (GRANT, 2007). Testes com harpagosideo não foi efetivo contra bactérias no qual o extrato da planta se mostrou eficaz, isso sugere que este composto pode não ser o principio ativo da planta como se acreditavam, e sim outro composto da planta representaria o principio ativo (AFOLAYAN; ADEBOLA, 2004).

Estudos com a *H. procumbens* indicam efeito anti-inflamatório, analgésico, efeito antioxidante, distúrbio gástrico intestinal como inchaço ou dispepsia, como utilitário para tratamento de doenças reumáticas, artrite, problemas de fígado, hipertensão, infecções do trato urinário, diabetes e malária (AFOLAYAN; ADEBOLA, 2004; GRANT, 2007). Sendo uma planta importante para indústria farmacêutica e homeopática. Weckesse *et al*, 2007 demonstrou que extrato da *H. procumbens* inibiu o crescimento de todas as bactérias aeróbicas e de duas cepas de bactérias anaeróbicas testadas em seu estudo. Em nosso laboratório foi demonstrado que, tratamento em camundongos com 15mg/kg do extrato etanólico da *H. procumbens*, reduziu significativamente o número de ovos de *Schistosoma mansoni* quando comparado com o grupo controle (dados não publicados). Foi demonstrado em nosso laboratório também que, tratamento com extrato etanólico da planta em camundongos infectados com *Salmonella enteritidis* modulou negativamente o recrutamento de células mononucleares para cavidade peritoneal, inibiu a produção de TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa - *Tumor Necrose Factor – Alpha*), diminuiu níveis de IL-10 (Inter Leucina – 10) e redução da hipertrofia das vilosidades (dados não publicados). Assim, a busca pelos efeitos dessas plantas em vermes de *Schistosoma mansoni in vitro* poderá contribuir com o maior entendimento dos efeitos e possíveis alvos nesse parasita, que possam favorecer o controle da esquistossomose.

## 1.5 - Proteoma

Após os avanços de sequenciamento de genomas, emergiu outro tipo de abordagem experimental em biologia, conhecida como análises proteômica, o qual abriu novos horizontes para pesquisa em várias áreas das ciências (VITZTHUM *et al*, 2005). Proteoma é um termo que se refere ao conjunto de proteínas encontrado em um organismo, tecido ou célula, quando sujeito a determinadas condições (NING *et al*, 2011). Análises proteômica são definidas como sendo o conjunto de métodos analíticos empregados com a finalidade de

caracterizar, qualitativamente e quantitativamente um Proteoma (CANTÙ, 2007).

O aumento do interesse por estudos de proteínas vem sendo ampliado a cada ano, esse crescimento de interesse se deve as potencialidades do estudo de proteínas. Os conjuntos de proteínas sintetizados não se referem apenas às respostas moleculares para determinado momento biológico, mas, também são observadas sutis variações no perfil das proteínas de acordo com o estado celular em resposta às condições externas ao organismo (AMARAL, 2006). O desenvolvimento de tecnologias e bancos de dados para análises de proteômicas que possibilita a identificação de inúmeras proteínas, tornando a proteômica uma ferramenta de grande importância.

O tipo de experimento realizado em análises proteômica para identificação de proteínas mais popular, e seguido neste trabalho, é a abordagem chamada *bottom-up*. Onde uma amostra protéica é inicialmente digerida em peptídeos com o uso de enzimas, como exemplo a protease tripsina (CHAIT, 2006).

Para o estudo da proteômica vários métodos são empregados, a fim de, responder os questionamentos que se referem a identificação dessas proteínas.

### **1.5.1 – Eletroforese Bidimensional**

Muitos estudos relacionados a proteômica baseiam-se em métodos de separação, para posterior detecção e identificação de uma determinada proteína. A técnica de eletroforese bidimensional (2-D), em gel de poliacrilamida é um método de separação de proteínas. Essa ferramenta tem a capacidade de fazer a análises de mais de 5.000 proteínas simultaneamente, e detectar apenas 1ng de proteína por *spot*, estabelecendo um mapa de proteínas, o que reflete a possíveis mudanças na expressão protéica, isoformas ou modificações pós-traducionais (NOGUEIRA, 2010).

Os fundamentos da eletroforese 2-D foram demonstrados pelo pesquisador Klose, em 1975. O fundamento da eletroforese 2-D resulta da combinação da

separação de proteínas por ponto isoelétrico (pI), ou seja pela focalização isoelétrica (IEF - *Isoelectric Focusing*), e da separação de acordo com o peso molecular de cada proteína em gel de poliacrilamida desnatante (BEZERRA-JÚNIOR *et al*, 2013; PEREIRA, 2008).

As proteínas são macromoléculas que são formadas por resíduos de aminoácidos que são ligados entre si, por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Os grupos terminais de uma cadeia polipeptídica podem apresentar um caráter anfotérico, atuando como aceitador de prótons ou como doador de prótons, dependendo do pH do meio em que se encontram. E as cadeias laterais dos aminoácidos podem ser apolares ou polares (NELSON; COX, 2006). Sendo assim, a carga total de um peptídeo é resultante das cargas existentes nos grupos terminais e nas cadeias laterais. Possibilitando assim, definir o ponto isoelétrico, ou seja, o pH no qual a carga total de uma proteína se torna nula. Possibilitando assim a IEF, obtida quando aplicado carga elétrica em uma amostra, contida em tiras de gel de acrilamida com gradientes de pH imobilizadas, tendo a migração das proteínas até o pH em que sua carga total seja nula (WESTERMEIER; NAVEN, 2005). O intervalo de pH é imobilizado em tiras com copolimerização de derivados de acrilamida, a combinação em determinada concentração define o intervalo e a forma de diversos comprimentos de diferentes faixas de pH (ALBERICE, 2014).

A segunda parte da eletroforese bidimensional remete a mobilidade eletroforética de acordo com a massa molecular de cada proteína, ou seja, as proteínas de menor peso molecular irão migrar mais rápido que, as de maior peso molecular (NOGUEIRA, 2010). O gel de poliacrilamida é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida, com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida. A polaridade da malha do gel pode ser definida de acordo com a concentração de acrilamida, quanto maior a concentração do polímero, menor serão os poros nos géis (ROCHA *et al*, 2005). O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), acrescentado no gel, associa-se às proteínas, formando um complexo micela-proteína, que apresenta carga global negativa, fazendo com que a separação eletroforética no gel de poliacrilamida dependa basicamente da massa molecular da proteína (CANTÚ, 2007).



A terceira parte da eletroforese bidimensional consiste na detecção de proteínas nos géis e nas análises das imagens dos géis por *software* após digitalização dos mesmos. Após a separação das proteínas, elas podem ser detectadas por métodos de coloração, sendo os mais utilizados o método de azul brilhante de *Coomassie* e Nitrato de Prata. Porém, podem ser utilizados outros métodos como fluorescência ou por métodos específicos como detecção com imunológicos (ROCHA *et al*, 2005). Por último, após análises e seleção dos *spots* por *software*, os mesmos são recortados dos géis e preparados (digestão com enzimas) para identificação, podendo ser identificados por espectrometria de massa(MAS). A digestão das proteínas presente nos *spots* recortados é realizada com uma protease (tripsina), e assim obtida uma solução com peptídeos (BEZERRA-JÚNIOR *et al*, 2013).

### 1.5.2 – Espectrometria de massa (MAS)

Após a separação das proteínas, análises e seleções dos *spots* detectados na eletroforese bidimensional, o passo seguinte é a identificação das proteínas nestes *spots*. Um método muito utilizado para a identificação de proteínas é a espectrometria de massas (MAS). Desde o surgimento desta técnica, ela tem sido largamente utilizada na análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular, uma técnica que mede a relação entre carga e massa ( $m/z$ ) de moléculas ionizadas na fase gasosa (MORAES, 2003; CANTÚ, 2007). Espectrômetro de massas pode ser considerado, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um separador ou filtro de massas (na realidade, massa/carga  $-m/z$ ) e um detector (MORAES, 2003). Antes da amostra ser submetida ao analisador de massas, ela deve ser ionizada e transferida para a fase gasosa, e no analisador de massas os íons são separados de acordo com sua relação  $m/z$  e posteriormente detectados (CANTÚ, 2007).

Um dos métodos para ionização da amostra é o *Electrospray* (ESI). Esta técnica de ionização pode ser acoplada à cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), para fracionamento molecular antes da análise por MAS, o que permite a análise

de moléculas grande e pequenas de várias polaridades presentes na amostra (HO *et al*, 2002). A ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo analitos é bombeado através de um fino capilar, uma alta tensão é então aplicada na ponta deste capilar, formando gotas altamente carregadas. Isso faz com que a amostra que sai pelo capilar seja dispersa em um aerossol que é composto por gotícula de solvente e analito altamente carregadas que seguem para o analisador de massas (BEZERRA-JÚNIOR *et al*, 2013).

O analisador de massa pode ser considerado como o ponto central da MAS, seus parâmetros fundamentais são: sensibilidade, resolução, precisão e a capacidade de espectros de massas de íons a partir de fragmentos de peptídeos (AEBERSOLD, 2003). Os analisadores de mais utilizados incluem o quadripolo (Q), *iontrap* (IT), *orbitrap* (OT), tempo de voo (TOF – *Time Of Flight*) e de ressonância ciclotrônica de íons (FTICR). Estes analisadores podem ser isolados ou em alguns casos, montados em conjuntos aproveitando o máximo de cada método (AEBERSOLD, 2003; ALBERICE, 2014).

Dessa forma, a escolha das técnicas de ESI e MAS foram fundamentais na obtenção dos resultados propostos neste estudo para compreensão dos efeitos dessas plantas na proteômica do *S. mansoni*.

## 2- Objetivos

Visto que, só se utiliza um fármaco contra o *S. mansoni*, e são encontradas cada vez mais cepas do parasito com perdas progressivas de sensibilidade, e caminhando para se tornarem resistentes a estes farmacos, é de extrema importância o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam eficazes e que promova menos reações adversas. Dessa forma, propomos estudar os efeitos antiparasitários da *Mentha piperita* L. e *Harpagophytum procumbens* no *S. mansoni*, *in vitro*. Sendo nossos objetivos neste estudo:

- ✓ Avaliar atividade motora, características do tegumento e taxa de mortalidade do *S. mansoni* exposto a diferentes frações (concentrado etanólico bruto, partição com Hexano - FH, acetato de etila- FA e hidroalcoólica-FHA) de extratos de *Mentha piperita* L. e do extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens in vitro*, por meio de microscopia óptica.
- ✓ Avaliar o estágio de desenvolvimento das células germinativas de ovos de *S. mansoni* expostos ao extrato etanólico da *Mentha piperita* L. *in vitro*, por meio de microscopia óptica com obtenção de imagem para análise.
- ✓ Avaliar por análise proteômica o efeito da *Mentha piperita* L. após a exposição dos parasitos a diferentes partições (concentrado etanólico bruto, partição com Hexano - FH, acetato de etila- FA e hidroalcoólica-FHA) de extratos de *Mentha piperita* L. *in vitro*, e do extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* utilizando ferramentas moleculares (Eletroforese bidimensional e Espectrometria de massa).

### **3–Material e Métodos**

#### **3.1 – Animais**

Para obtenção dos vermes adultos utilizados nos ensaios *in vitro* foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com aproximadamente 4 semanas de idade e provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP–USP), livres de patógenos (*Specific Pathogen Free- SPF*) e com livre acesso à água e alimento. Após a infecção, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlo (DMP-UFSCar) com livre acesso à água e alimentos (ração comercial para roedores).

#### **3.2 - Obtenção das larvas infectantes do *Schistosoma mansoni* (cepa LE)**

As larvas (cercárias) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina (FMRP-USP), a partir de caramujos infectados com o *Schistosoma mansoni* (cepa LE) mantidos no Moluscário da mesma instituição.

#### **3.3 - Infecções dos camundongos com as larvas infectantes (cercárias) do *Schistosoma mansoni***

Os camundongos foram infectados via subcutânea (s.c.) com as cercárias do *S. mansoni*, onde foram inoculadas 150 cercárias em uma solução fisiológica 0,9 %NaCl, com o auxílio de uma seringa de 1 mL. O método de infecção foi previamente padronizado pela técnica de laboratório Olinda Mara Brigoto, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP.

### **3.4 - Recuperação de ovos e dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni***

Sete semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados e os vermes foram recuperados com a técnica de perfusão do sistema porta hepático. A perfusão nos animais foi feita utilizando-se meio tampão salina citratada (NaCl 0,9% e Citrato 0,05%). Este método já foi utilizado por outros pesquisadores (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956), sendo demonstrada sua eficácia, pela recuperação de vermes adultos do sistema porta e pela persistente infecção por longo período. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal aprovados pelo CEEA n. 008/2009.

Para recuperação de ovos, vermes adultos do *Schistosoma mansoni* foram incubados por 48h em meio de cultura RPMI -1640, com temperatura controlada a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os parasitas foram removidos dos poços de cultura com o auxílio de uma pipeta Pasteur e no meio de cultura que continha os ovos foi adicionado os extratos da *Mentha piperita* L. e de *Harpagophytum procumbens*. Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos- CEEA/UFSCar em anexo.

### **3.5 – Obtenção dos extratos etanólicos da *Mentha piperita* L. e da *Harpagophytum procumbens***

O extrato da *M. piperita* L. etanólico foi cedido pelo Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento, Professor do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara. Para a preparação dos extratos, as folhas de Hortelã Pimenta secas (gentilmente cedidas pelo Prf. Dr. Luis Vitor do Sacramento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista) e da *H. procumbens* foram mantidas em uma solução de hipoclorito para descontaminação e posteriormente secas em estufa a 37°C durante três dias,

após este processo o material foi triturado até a obtenção do pó, o qual pesado, a cada 100 gramas foi acrescentado 1000 mL de álcool etílico absoluto. Os béqueres contendo esta solução foram mantidos em temperatura ambiente durante 72 horas com uma agitação diária, após o qual foi filtrado em papel de filtro, e novamente completado com a mesma quantidade de etanol, este processo foi repetido três vezes.

Os filtrados foram concentrados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química – UFSCar, com a supervisão do Dr. Paulo Cezar. Para a concentração foi utilizado um rota-vapor (BUCHI) mantido na temperatura entre 40 a 45°C até a formação de uma “papa”, o qual foi transferido para um recipiente de vidro em uma capela com fluxo de ar até a eliminação do solvente, obtendo assim o extrato seco.

### **3.6 - Fracionamento do extrato etanólico da *Mentha piperita* L.**

A separação dos componentes da *M. piperita* foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para a extração da porção apolar, o extrato etanólico da *M. piperita* foi colocado em um funil de separação e é adicionado hexano [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>] no volume de 1/3 da amostra (250 ml). Posteriormente se fez agitação do funil para homogeneizar o extrato da *M. piperita* com o hexano. O hexano faz com que a parte apolar do extrato etanólico se separe das demais partes do extrato. Após a separação, esta porção é levada para o rota-vapor para a retirada do hexano por evaporação. Este material foi colocado em um recipiente de vidro e deixado para secar em uma capela em temperatura ambiente, restando apenas uma amostra seca do concentrado da partição Fracionada com Hexano (FH) da *M. piperita*.

Para extração da porção com polaridade mediana, o extrato da *M. piperita* posterior à remoção da porção apolar é colocado em um funil de decantação e é adicionado acetato de etila [CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] no volume de 1/3 da amostra

(250 ml). Posteriormente se fez agitação do funil para homogeneizar o extrato da *M. piperita* com o acetato de etila. O acetato de etila fará com que a porção com polaridade mediana do extrato etanólico se separe das demais partes do extrato. Após a separação, esta porção é levada para o rota-vapor da mesma forma como se fez com o hexano e deixado secar em temperatura ambiente em uma capela com fluxo, restando apenas a amostra seca da partição Fracionada com Acetato de etila (FA) da *M. piperita*.

O restante da amostra, após a remoção das duas primeiras partições, foi considerado como a partição Fracionada Hidro alcoólica (FHA), sem necessidade de adicionar nenhuma outra substância, uma vez que as outras duas partes (apolar e de polaridade mediana) já foram retiradas do extrato etanólico. Este restante da amostra, da mesma forma, foi feita a remoção do solvente pelo rota-vapor, para a retirada do álcool etílico presente. Posteriormente a secagem total foi feita capela com fluxo.

### **3.7 - Cultura do *Schistosoma mansoni***

Os parasitos recuperados após perfusão via porta hepática foram lavados em meio de RPMI-1640, mantidos em pH 7,5 suplementados com 20mM de HEPES completado com penicilina ( $100\mu\text{LmL}^{-1}$ ), estreptomicina ( $100\text{mg/mL}^{-1}$ ) e 10% de soro fetal bovino (SMITHERS; TERRY, 1965).

Após a lavagem, cada casal de parasitos adultos (o macho acasalado à fêmea) foi transferido para um poço de uma placa de 24 poços contendo 2ml do mesmo meio usado para lavagem. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h, as placas com as culturas de *S. mansoni* foram incubadas com o extrato etanólico e diferentes frações da *M. piperita*, e com o extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* dissolvidas em 0,1% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e adicionadas em meio RPMI-1640 para chegar a concentrações finais de 500, 1000, 1500, 2000 e 2500µg dos extratos etanólicos e das frações da *M. piperita*. Os casais de parasitas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente,

e foram monitoradas em 24 e 120 horas após a incubação com os extratos, foram avaliadas as condições gerais dos parasitas como: Números de casais separados; números de vermes mortos; redução na atividade motora; números de vermes com alteração no tegumento e número de ovos (após 120h) (KNOBLOCH; KUNZ; GREVELDING, 2006; XIAO *et al.*, 2007; MAGALHÃES, *et al.* 2008). Como controle negativo por meio de uma placa de cultura incubada somente com meio RPMI-1640 a 0,1% de DMSO. Como controle positivo, foi incubada em uma placa de cultura com 10 $\mu$ M de PZQ (Praziquantel) adicionado ao meio RPMI-1640 a 0,1% de DMSO. Os experimentos foram realizados em quadruplicada. Para o desenvolvimento dos ovos, os ovos foram mantidos incubados nas mesmas condições e analisados o desenvolvimento após 120 horas, os ovos foram analisados como descrito por Michaels e Prata (1968). Foi utilizado como controle negativo meio RPMI 1640 e meio RPMI com 0,1% de DMSO (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Para o teste de viabilidade do parasito, casais adultos foram incubados por 24 e 120 horas nas mesmas condições, na presença dos extratos etanólicos, nas concentrações de 500 – 2500  $\mu$ g/mL. O teste foi realizado pelo ensaio colorimétrico baseado no 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid (MTT) (COMLEY *et al.*, 1989). Posteriormente a cada período de cultura, os casais de verme adulto foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo 100 $\mu$ L de tampão PBS com 0,5mg/mL de MTT por 30 minutos a temperatura de 37° C. Depois deste período a solução foi removida cuidadosamente removida e foi adicionado 200 $\mu$ L de DMSO por 1 hora. A absorbância foi lida utilizando um filtro para 550nm, o DMSO foi usado como o branco da reação. Para controle negativo foi utilizado casais de vermes adultos mantidos em meio RPMI 1640 com 0,1% de DMSO e como controle positivo, foram utilizados casais de vermes adultos mortos a 56° C por 30 minutos. Foram realizados quatro experimentos independentes, sendo avaliados quatro casais de vermes por concentração em cada experimento.

Para a realização da extração de proteínas e posteriormente a realização da eletroforese bidimensional, foram feitas culturas em garrafas nas mesmas condições já descritas, contendo 80 casais de vermes adultos por cultura, no período de 24 horas, foi realizada cultura com os extratos etanólico da *M.*



*piperita* nas concentrações de 800 µg/ml, com extrato etanólico da *H. procumbens* (500 µg/ml) e da partição FA, FH na concentração de 500µg/mL e a partição de FHA na concentração de 1000 µg/ml. Como controle foi feita uma cultura com vermes adultos com meio RPMI -1640 com 10% de DMSO.

### 3. 8 - Extração das proteínas totais do *Schistosoma mansoni*

A extração proteica foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Emanuel Carrilho do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP). A extração das proteínas totais vermes adultos foi padronizada com 80 casais, foi preparada em 40 mM Tris, pH 7,4, SDS 2% mais coquetel inibidor de protease (Tabela 1), por sonicação com 4 ciclos de 2 minutos, com pulsos de 0,75 s, 40% da amplitude (FARIAS, 2010). Foi acrescentado acetona na amostra para precipitação das proteínas, sendo colocada 9 volumes de acetona gelada a -20°C para 1 volume da amostra, após fazer esta mistura a amostra foi homogeneizada e mantida a -20°C *overnigth*, posteriormente a amostra foi centrifugada em 12000g x por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado secar em temperatura ambiente e posteriormente solubilizado em tampão de corrida da eletroforese (Tris-base, glicina , SDS e água).

**Tabela 1:** Composição do coquetel Inibidor de Protease na concentração de 10X. Foi dissolvido na concentração de 1X somente na hora do uso, as substâncias foram dissolvidas em etanol 100%, foi utilizado 10µL de coquetel inibidor para cada 1mL de amostra. O PMSF foi adicionado na hora do uso.

Substancia	Quantidade
Aprotinina	1,0 mg/mL
Leupeptina	1,0 mg/mL
Pepstatina A	1,0mg/mL
PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor)	100mM

### 3.8.1 - Determinação da Concentração de Proteínas

A determinação de proteínas totais da amostra foi feita de acordo com o método de BRADFORD ( 1976). Sendo utilizada como padrão a proteína albumina de soro bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*), a curva da concentração de proteínas foi feita utilizando o *software* Origin. Após fazer a curva no *software*, foi usada para quantificação da proteína a formula:

$$Y= A+B.X$$

Onde Y é a absorbância da amostra, A e B são dados obtidos pala curva no *software* Origin e X é a concentração de proteína da amostra.

## 3. 9 - Eletroforese bidimensional

### 3.9.1 - Focalização Isoelétrica

Antes de fazer a focalização isoeétrica é preciso fazer a reidratação da fita IPG Gradiente de pH Imobilizado (*Immobilized pH Gradiente- IPG*), onde a amostra foi adicionada na solução de reidratação (7mol L<sup>-1</sup>de uréia, 2 mol L<sup>-1</sup> de tiouréia (opcional), 2% CHAPS (detergente não iônico), de 0,5 até 2% de IPG buffer, 0,002% de azul de bromofenol). Foram utilizadas 240µg de proteínas para a reidratação das fitas IPG, totalizando um volume de 250µl para reidratação, as amostras foram diluídas com solução de reidratação para chegar neste volume total, sem alterar a quantidade de proteínas presente para reidratação. A diferença de volume da amostra entre os grupos foi para que,

em cada fita IPG tivesse a mesma quantidade de proteína. A reidratação das fitas IPG foi feita “*overnight*”, após este período as fitas foram transferidas para o Ettan IPGphor 3 da *GE Healthcare*, equipamento utilizado para a focalização isoeletrica. Posterior à primeira dimensão foi feita redução e alquilação das fitas IPG. O Ditotritol DTT foi adicionado na concentração de 7mg/2,5mL, tanto o DTT quanto o IPG *buffer*, foi adiciona hora do uso, é de grande importância ser adicionado o IPG tampão, pois ele vai aumentar a solubilidade das proteínas e auxiliar para uniformidade do gradiente de pH sem afetar a forma do gradiente (CANTÚ, 2007). Esta mistura da amostra com a solução de reidratação foi adicionada em uma canaleta e a fita IPG (linear) foi posicionada em cima da amostra de modo que, de gel de acrilamida ficou voltado para baixo, fazendo com que a fita ficasse em inteiramente em contato com a amostra. A etapa de reidratação da fita foi feita *overnight* (de 12 a 18 horas), após este período a fita foi preparada e colocada em um campo elétrico para a focalização isoeletrica. Foi utilizada uma fita de 13 cm com intervalos de pH entre 3-10 dispostos de forma não linear, sendo colocado 250 µL da solução da amostra com a solução de reidratação. Nesta etapa também foi adicionado *drystrip cover fluid* (óleo mineral) em quantidade suficiente para cobrir a fita, este liquido tem como objetivo de evitar que a fita resseque (CANTÚ, 2007).

Antes de colocar a fita com a amostra no equipamento (IPGpho) para se fazer a focalização isoeletrica, foi retirado o excesso de óleo, e posteriormente colocada no suporte do IPGpho, posicionada com o gel para cima de modo que a extremidade ácida ficou posicionada no lado positivo (anódico), enquanto que, a extremidade básica ficou voltada para o lado negativo (catódico). Foi colocado papel de filtro, para se fazer a ponte de papel, dois pedaços de papeis foram molhados e os eletrodos foram posicionados em cima destes papeis, a fim de estabelecer um contato entre a fita e os eletrodos. Por fim foi adicionado 3 mL de *drystrip cover fluid*.

Ao termino da focalização isoeletrica foi feita a redução e alquilação das proteínas as fitas. A primeira vezes a ser equilibradas, as fitas foram equilibradas utilizando 5 mL de DTT, por 15 minutos com agitações, e na segunda vez a ser equilibrada foi utilizado adicionando 5 mL de iodoacetamina (IAA) e agitando por 15 minutos. A adição de DTT tem como objetivo clivar as

pontes de dissulfeto das proteínas presentes nas fitas de IPG após a focalização isoeletrica, como esta reação é reversível o IAA é adicionado para reagir com a terminação SH das proteínas impedindo com que volte ter as pontes de dissulfetos (CANTÚ, 2007).

### 3.9.2 - SDS-PAGE

Após a fase de focalização isoeletrica, as fitas foram transferidas para a etapa da segunda dimensão, onde ocorre a separação proteica de acordo com a massa molecular relativas em um gel de acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com LAEMMLI (1970). As fitas foram colocadas no topo do gel de acrilamida 10% e seladas com agarose 0,5% com azul de bromofenol (ROCHA *et al*, 2007). A corrida foi feita em um sistema eletroforético em baixas temperaturas, para se evitar o aquecimento, a corrida foi interrompida quando o azul de bromofenol atingir o final do gel. (ROCHA *et al*, 2007).

A corrida da eletroforese foi efetuada em dois passos: Passo (1) – 15mA/gel por 15 minutos. Passo (2) – 45 mA/gel até o final da corrida.

### 3.9.3 - Detecção das proteínas nos géis

A coloração do gel foi feito método de coloração com “*Coomassie Blue*” (Tabela 2), utilizando fixing (40% etanol diluído em uma solução de 10% Ác. Acético em água), destain (20% etanol diluído em uma solução de 5% ácido acético em água) preserving (solução com 5% de ácido acético em água) e a o coomassie 0,02%. Este método é largamente empregado para a detecção de proteínas (MORRISSEY, 1981). Após a coloração os géis foram digitalizados por um *scanner* e analisados pelo *softwareImageMaster Platinum 2D 7*(GE healthcare).

**Tabela 2:** Procedimento para coloração do Gel–SDS, utilizando o método de revelação de proteínas no gel SDS.

Etapa	Tipo de Solução	Tempo de contato (minutos)
1	<i>Fixing</i>	30
2	<i>Destain</i>	3
3	<i>Coomassie 0,025%</i>	90
4	<i>Destain</i>	15
5	<i>Destain</i>	45
6	<i>Destain</i>	120
7	<i>Destain</i>	120
8	<i>Preserving</i>	30

### 3.9.4 - Digestão dos géis

Após realizar a eletroforese bidimensional e a detecção das proteínas nos géis, foi feito os recortes dos *spots* presentes nos géis e a digestão dos géis para ser realizada a espectrometria de massa. A digestão dos géis foi feita seguindo o protocolo de digestão in gel disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massas, CeBiME. No qual cada *spot* recortado dos géis foi submetido ao mesmo processo, como descrito a seguir: Para a descoloração do gel, foi feita incubação por 2h em 0,5mL de destain (metanol com 50% de ácido acético e 2,5% de água purificada) em temperatura ambiente. Após as 2h foi retirada a solução de destain e foi adicionado mais 0,5mL da mesma solução por mais 1h. Depois da descoloração do gel, o destain foi removido e foi adicionado 200µl de acetonitrila (100%) por 5 minutos, para a desidratação do gel, este passo foi repetido duas vezes. Posteriormente a acetonitrila foi evaporada e o gel foi lavado com 100ul de bicarbonato de amônio a 100mM por 10 minutos e em seguida o gel a solução foi removida e o gel foi desidratado novamente por 5 minutos com 200µL de acetonitrila (100%), este passo foi repetido novamente utilizando 200µl de bicarbonato de amônio. Após a evaporação da acetonitrila da ultima etapa, foi acrescentado de 30 a 50µl da

solução de trisipicina (20µg de tripsina em 1000µl de bicarbonato de amônio a 50 mM gelado, concentração final da tripsina foi de 20ng/µL), por 30 minutos em banho de gelo para fazer reidratação dos géis. Depois destes períodos foi removido o excesso da solução de tripsina e acrescentado de 5 a 20µl de bicarbonato de amônio a 50 mM de modo a cobrir o gel e foi deixado *overnight* a 37°C. A etapa de extração das proteínas foi feito no dia seguinte, sem retirar a solução da etapa anterior, foi acrescentado 10µL de ácido fórmico (5% diluído em água pura) por 10 minutos a temperatura ambiente, dando um *spin* rápido e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. No próximo passo foi acrescentado 12µL de uma solução com 5% de ácido fórmico diluído em 50% de acetonitrila (pode ser adicionado até 30µL desta solução em um pedaço do gel, caso seja grande) foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, foi dado um *spin* rápido e o sobrenadante foi adicionado no mesmo tubo do passo anterior, este passo foi repetido 3 vezes. Por fim o tubo contendo os sobrenadantes foi evaporado de forma a restar aproximadamente 1µL da amostra e foi armazenado a -20°C .

### **3. 10 - Espectrometria de massa**

#### **3.10.1 - Preparação da amostra para a espectrometria de massa**

Após a digestão dos géis, os *spots* separados em tubos cônicos 1,5 mL foram totalmente secos, após a secagem foram suspensos em Ácido fórmico 1% e centrifugados por 5 minutos. Estas amostras suspensas no ácido fórmico foram então analisadas no espectrômetro de massa.

#### **3.10.2 - Ionização por Electrospray**

Foi utilizada a técnica de espectrometria de massas com ionização em *electrospray*, no qual os íons são transferidos da fase líquida para a fase gasosa, provocando a separação dos íons, fragmentação e formação de íons a

partir de moléculas neutras (MORARES, 2003). No capilar do espectrômetro, potencial positivo é aplicado na amostra, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, com aumento da tensão elétrica e o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo presente no espectrômetro, faz com que ocorra uma deformação na gota da amostra, ganhando assim uma forma de cone, denominado *Cone de Taylor* (MORARES, 2003; KLITZKE, 2012). Aumentando ainda mais a força eletrostática ocorre o rompimento da tensão superficial e a liberação de pequenas “gotas” com alta densidade de cargas, fazendo com que a amostra (líquido analito) seja dispersa por *electrospray* em um aerossol (KLITZKE, 2012). Este processo ocorre dependentemente da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (MORARES, 2003; KLITZKE, 2012).

### 3.10.3–Analisadores de massas

Neste estudo o analisador de massas foi do tipo de Quadrupolo / Tempo de Voo (QTOF – Quadrupole Time of Flight) e o *Iontrap Líneas-Orbitrap* (LTO Orbitrap Velos, ThermoScientific). Para ambos os equipamentos as amostras foram processadas de mesma forma e ambos contêm equipamento de cromatografia líquida acoplada a com a ionização por *electrospray* (ESI).

O analisador TOF foi utilizado no Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBio – CNPEM) na cidade de Paulínia, próximo a Campinas-SP, para as análises das partições de Acetato de Etila e Hexano e um controle para estas amostras. Com este equipamento foi utilizado a cromatografia líquida *NanoAcquity* UPLC (Waters) acoplado com um espectrômetro de massas do tipo Q-tof Ultima (Waters). Os íons foram selecionados com carga positiva entre +2, +3 e +4. A solução é bombeada através de um capilar (de 50 a 100 µm de diâmetro), sendo empregada a vazão de carga de 0,600 µL/min, com limite de pressão de 9000psi, a temperatura da amostra se manteve em 4°C.

O analisador de massas LTQ *Orbitrap Velos*, foi utilizado no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC –USP), na cidade de São Carlos-SP, este analisador foi utilizado para análises das proteínas dos grupos com tratamento do extrato etanólico da *M. piperita*, partição Hidro-Alcoólica da *M. piperita*, e do extrato etanólico da *H. procumbens* e controle sem tratamento. Este analisador equipamento de cromatografia líquida (*EASEnLCII, ThermoScientific*) acoplado com o espectrômetro de massas. As análises foram feitas no modo *scan* no intervalo de 400-2000 *m/z*, modo positivo com tensão capilar de 4500 V, nebulizador a 8,0psi.

### **3.10.4 – Processamento dos dados após a identificação das cadeias peptídicas**

Após os resultados serem processados, os espectros foram processados, para as amostras analisadas no qTOF foi utilizando o programa Mascot que faz uma busca contra um banco de dados de proteínas de *S.mansoni*, permitindo assim a identificação das proteínas a partir dos peptídeos gerados para cada *spot* dos géis.

Este programa apresenta o resultado tendo um valor limite (pontuação ou *score*). A pontuação dos íons é de  $-10 \cdot \log(P)$ , onde “P” é a probabilidade de que a amostra analisada é um evento aleatório. Proteínas com pontuação (*scores*) abaixo são tidas como eventos randômicos, ou seja, sem valor estatístico. Por outro lado, quando a proteína excede este valor limite as chances de ser um evento randômico é menor que 5%, ou seja, quanto maior a pontuação (*scores*) da proteína maior a probabilidade da identificação ou homologia da amostra de estar correta ( $p < 0,05$ ). Por este motivo neste trabalho será considerada apenas as proteínas que esteja acima do *score* mínimo dado pelo programa, este valor varia entre os *score* de 27 e 28 (valores obtidos e dados pelo *software* MASCOT para cada amostra).

Para os resultados processados pelo LTQ *Orbitrap* foi utilizado o *software* ProteomeDiscover1.3 (*ThermoScientific*). Este programa foi utilizado com o



método de análise *Sequest*, este método é baseado em pontuação (*score*) que vai ser de acordo com oXCorr, que representa a correlação cruzada dos espectros de massa experimental para os espectros de massas teóricas. Esta correlação analisa tanto a posição de massa e a intensidade e pelo “ $\Delta$  score” que representa  $(XCorrdo\ 1^\circ\ peptídeo - XCorrdo\ 2^\circ\ peptídeo) / XCorrofdo\ 1^\circ\ peptídeo$ . Neste experimento foram utilizados os seguintes critérios: peptídeos com carga +1 foi utilizado  $XCorr \geq 1,90$ ; para pepitidos com carga +2,  $XCorr \geq 2,2$  e peptídeos com carga +3 foi considerado  $XCorr \geq 3,75$ , e para todos os casos foi considerado  $\Delta Cn > 0.1$  (CANTU, 2008).

## 4 – Resultados

### 4.1 - Efeito do extrato etanólico de *Mentha piperita* L. sobre vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro*

O efeito do extrato etanólico da *M.piperita* durante o cultivo de *S. mansoni* foi analisado nas concentrações de 500 a 2500 µg/mL. No grupo controle, sem tratamento com a *M. piperita*, os casais de *S. mansoni* se mantiveram acoplados sem alterações (Figura 1). Como pode ser observada na tabela 3, a concentração de 500 µg/mL de *M. piperita* não causou efeito nos parasitas nos tempos analisados. Nas concentrações de acima de 1000 (Figura 2) e 1500 µg/mL no período de 24 horas de cultura, foi observada separação dos casais de vermes e redução significativa da atividade motora, pouca expressão na mortalidade, embora, não tenha sido observadas alterações no tegumento (Tabela 3). Porém, nestas mesmas concentrações no período de 120 horas foi observado aumento no número de casais mortos para 87,5% e 100% respectivamente (sete casais mortos na concentração de 1000 µg/mL e oito casais na concentração de 1500 µg/mL), e em 1000 µg/mL foi observado dois casais com alterações parciais do tegumento (Tabela 3).

Nas concentrações de 2000 e 2500 µg/mL foi observada separação, mortalidade, e significativa redução da atividade motora em todos os casais analisados, em todos os períodos estudados. E também nos mesmos períodos e concentrações, 2 casais apresentaram alterações parcial do tegumento, como demonstrado na Tabela 3.



**Figura 1:** Foto representativa da cultura do grupo controle de *Schistosoma mansoni* aumento de 100x. O casal se manteve acoplado.



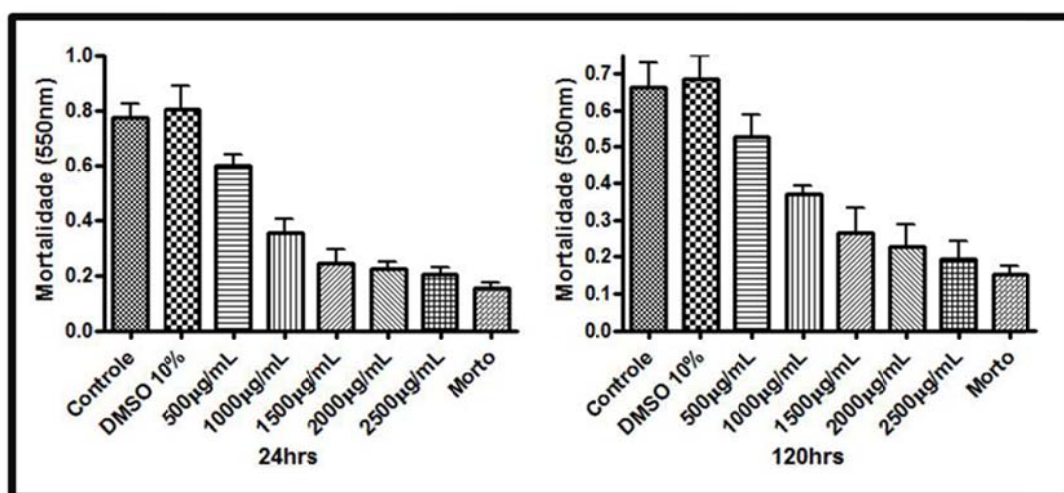
**Figura 2:** Foto representativa da cultura de *Schistosoma mansoni* com tratamento de 1000µg/mL da *Mentha piperita* L. aumento de 40x. Sendo demonstrada a separação do casal de parasito nesta concentração, e os vermes mortos.

**Tabela 3:** Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L., em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, no período de 24 e 120 horas de tratamento.

Grupo	Porcentagem de casais (%)	Tempo de incubação (h)	Porcentagem de casais separados (%)	Porcentagem de casais mortos (%)	Redução na atividade motora (%)		Porcentagem de vermes com alteração no tegumento (%)	
					Não significativa	Significante	Parcial	Extensivo
Controle	8	24	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0
DMSO 10%	8	24	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0
PZQ	8	24	0	100	0	100	25	75
		120	0	100	0	100	25	75
Extrato etanólico da <i>M. piperita</i>	8	24	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0
500 µg/mL	8	24	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0
1000 µg/mL	8	24	100	25	0	75	0	0
		120	100	87,2	0	100	25	0
1500 µg/mL	8	24	100	37,5	0	100	0	0
		120	100	100	0	100	0	0
2000 µg/mL	8	24	100	100	0	100	25	0
		120	100	100	0	100	25	0
2500 µg/mL	8	24	100	100	0	100	25	0
		120	100	100	0	100	25	0

## 4.2 - Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. sobre a mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*

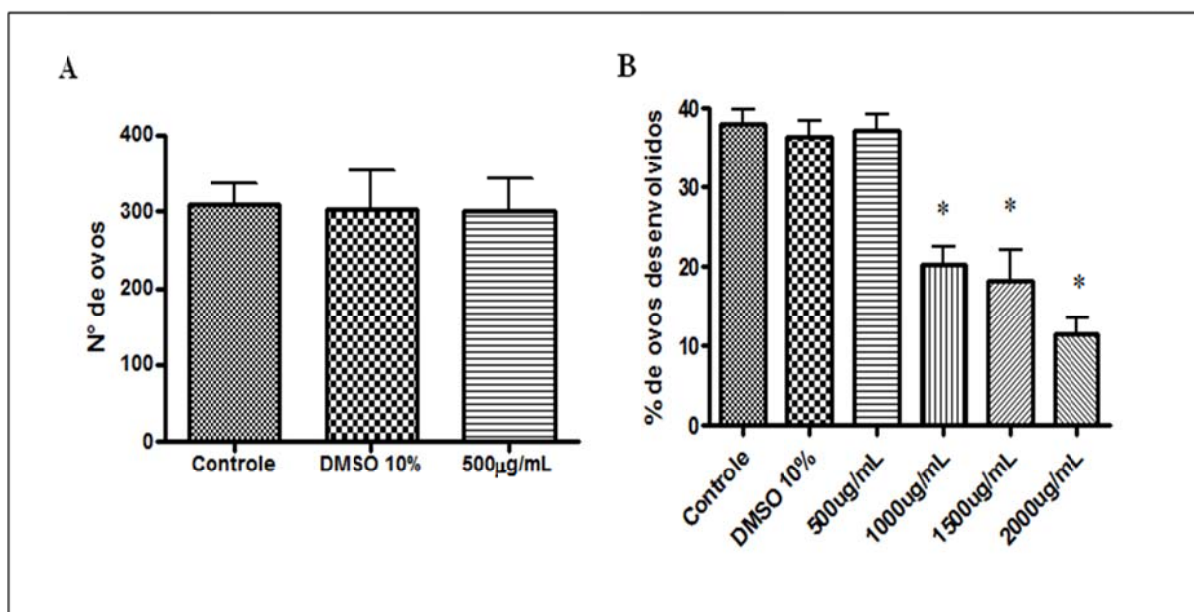
A viabilidade dos parasitas foi avaliada utilizando o método de Brometo de 3-(4,5 -dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóli (MTT). Como observada na Figura 3, ocorreu discreta redução na mortalidade na concentração de 500µg/mL, quando comparada com os controles. Porém, nas concentrações entre 1000 – 2500 µg/mL foi observado redução significativa na mortalidade dos parasitas, durante 24 e 120 horas, quando comparado com o controle positivo e negativo (Figura 3).



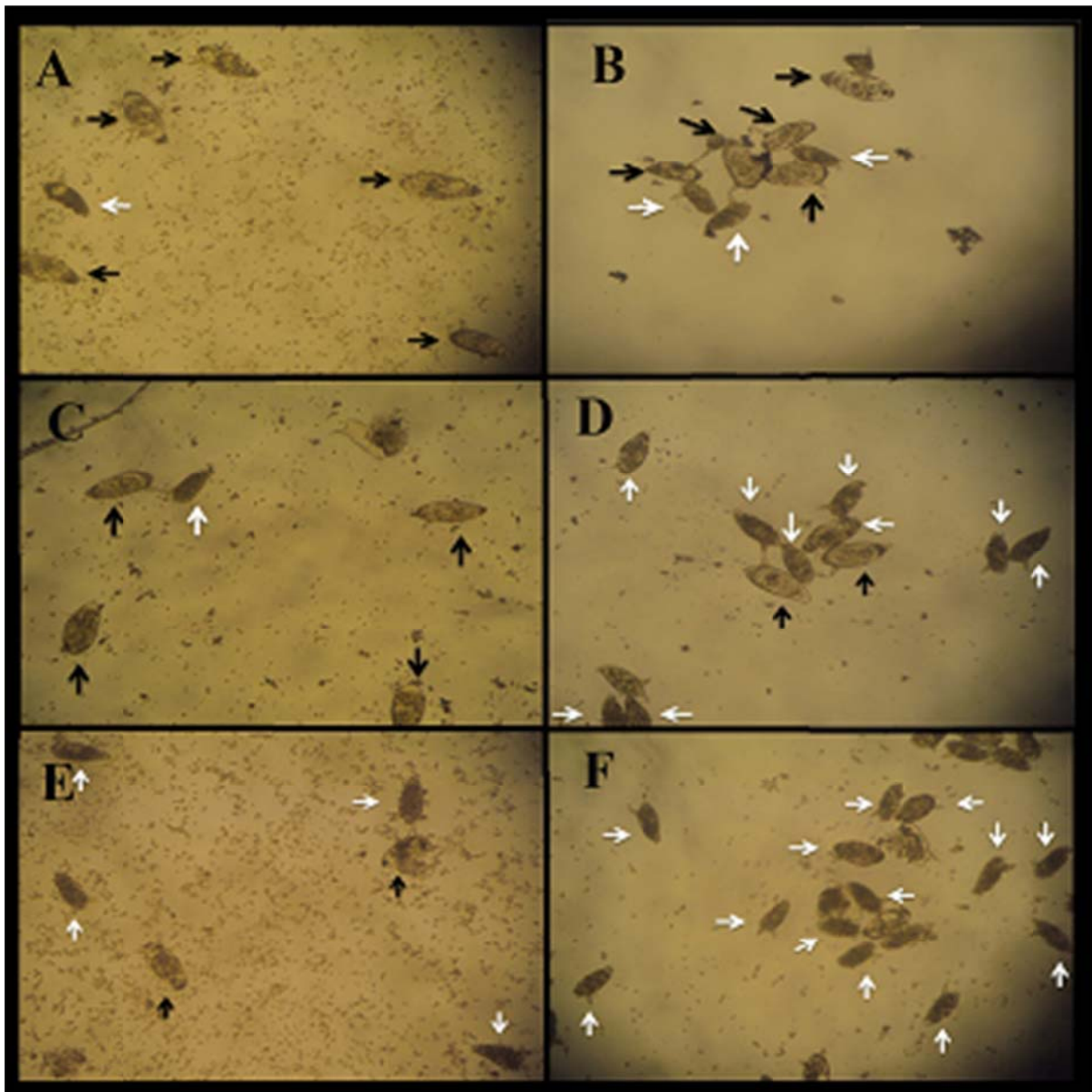
**Figura 3:** Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. na mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*: sendo avaliados nas concentrações de 500, 1000, 1500, 2000, 2500µg/mL, no período de 24 e 120 horas. O teste de viabilidade foi feito utilizando o método de MTT com filtro de leitura em 550nm \*p<0.0001.

### 4.3- Efeito da *Mentha piperita* sobre a oviposição e desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*

O efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* sobre a oviposição do *S. mansoni* foi observada em uma concentração no qual não ocorreu a separação e morte dos casais (500µg/mL, Figura 4A), para se evitar alterações e falsos resultados da ovoposição dos parasitas, foi analisado o período de 120 horas de tratamento. A porcentagem de ovos desenvolvidos foi analisada nas concentrações de 500 – 2000µg/mL, depois de 120 horas com o extrato etanólico da *M. piperita* (Figura 4B e Figura 5). Na concentração analisada, 500µg/mL, não foi observada diferença estatística do numero de ovos em comparação com os controles, como observada na Figura 4A e na Figura 5. Porém, nas concentrações de 1000-2000 µg/mL causou redução significativa na porcentagem de ovos desenvolvidos, em comparação com os controles (Figura 4B e Figura 4 C-F).



**Figura 4:** Efeito da *Mentha piperita* L. sobre a oviposição e no desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*: A- Oviposição, Os números de ovos foram analisados apenas na concentração de 500µg/mL, por 120 horas, por ser uma concentração que não causou morte e nem separação dos casais. B – Análise quantitativa do desenvolvimento dos ovos \*p<0.001. Foram analisados com diferentes concentrações do extrato por 120 horas.



**Figura 5:** Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* em ovos de *S. mansoni*. Grupo controle com 0,1% de DMSO (A) e nas concentrações de 500µg/mL (B), 1000 µg/mL (C), 1500 µg/mL (D), 2000 µg/mL (E) e em 2500 µg/mL (F) do extrato etanólico da *M.piperita*. A seta na cor preta representa ovos viáveis e a seta na cor branca representa ovos inviáveis.

#### **4.4 - Efeito das partições do extrato de *Mentha piperita* L. no pareamento, sobre os vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro***

As partições FA, FH e FHA *M. piperita* foram avaliadas em cultura de *S. mansoni*, nas concentrações de 500-2500µg/mL no período de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Como pode ser observada na Tabela 4, a partição com acetato de etila (partição FA) causou morte e separações em 50% dos casais na concentração de 500 -1500µg/mL em todos os períodos. Nas concentrações de 1000µg/mL durante 120 horas matou 75% dos vermes machos e 50% das fêmeas, com 1500µg/mL durante 120 horas foi observada a morte de 75% dos vermes machos e fêmeas, em ambas as concentrações continuaram sendo observado 50% de separações dos vermes adultos no período de 120 horas (Tabela 4). Foi observado nas concentrações de 2000 e 2500µg/mL morte e separações dos casais de vermes em 50% nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Nos períodos de 96 e 120 horas após o tratamento com esta partição foi observado separação de 50% e morte de 100% dos casais de vermes de *S. mansoni* (Tabela 4). O controle positivo (10 µg/mL Praziquantel) teve 100% dos vermes mortos e nenhum casal separado, o controle negativo, com DMSO (0,1%), não apresentou nenhum casal separado e nenhuma morte dos vermes adultos (Tabela 4).



**Tabela 4:** Efeito da partição com Acetato de etila do extrato da *M.piperita* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Porcentagem de Casais Separados (%)	Porcentagem de Vermes Mortos (%)		Porcentagem de vermes com redução na atividade motora (%)				Porcentagem de vermes com alteração no tegumento (%)			
			M	F	Não significativa		Significante		Parcial		Extensivo	
					M	F	M	F	M	F	M	F
Controle DMSO	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PZQ	24	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato de <i>M.piperita</i> – Partição Ac. de etila												
500µg/mL	24h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1000µg/mL	24h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1500 µg/mL	24h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2000µg/mL	24h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2500µg/mL	24h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	48h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1000 µg/mL	48h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1500 µg/mL	48h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2000 µg/mL	48h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2500 µg/mL	48h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	72h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1000 µg/mL	72h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1500 µg/mL	72h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2000 µg/mL	72h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2500 µg/mL	72h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	96h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1000 µg/mL	96h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1500 µg/mL	96h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
2000 µg/mL	96h	50	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
2500 µg/mL	96h	50	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
500 µg/mL	120h	50	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
1000 µg/mL	120h	50	75	50	0	0	75	50	0	0	0	0
1500 µg/mL	120h	50	75	75	0	0	75	75	0	0	0	0
2000 µg/mL	120h	50	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
2500 µg/mL	120h	50	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0

A cultura com tratamento da partição com hexano está demonstrada na Tabela 5, no qual todas as concentrações (500 – 2500 µg/mL) durante todos os períodos foram observadas 25% da separação dos casais de *S.mansoni*. Nas concentrações de 500 – 2000µg/mL foram observados 50% de mortes dos vermes machos e 25% de morte dos vermes fêmeas durante todos os períodos (Tabela 5). E na concentração de 2500µg/mL foram observados 50% de morte dos vermes machos e 50% de morte das fêmeas, em todos os períodos (24 – 120 horas) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Efeito da partição com Hexano do extrato da *M.piperita* sobre vermes adultos de *Schistosomamansoni*. Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.

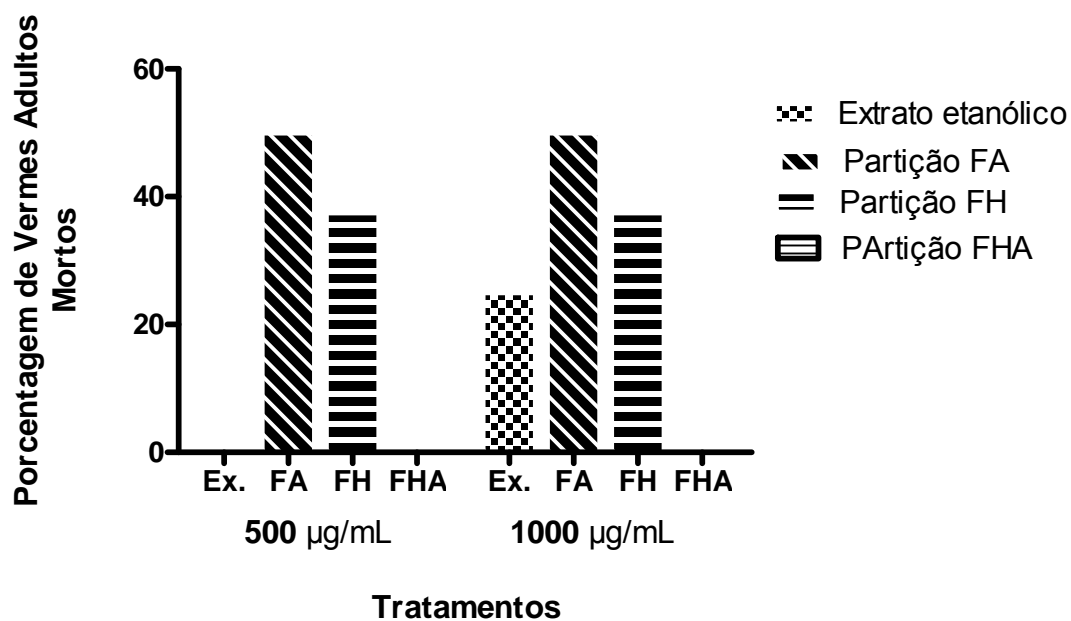
Grupo	Tempo de incubação (h)	Porcentagem de Casais Separados (%)	Porcentagem de Vermes Mortos		Porcentagem de vermes com redução na atividade motora (%)				Porcentagem de vermes com alteração no tegumento (%)			
			M	F	Não significativa		Significante		Parcial		Extensivo	
					M	F	M	F	M	F	M	F
Controle DMSO	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PZQ	24	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato de <i>M.piperita</i> – Partição Hexano												
500µg/mL	24h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1000µg/mL	24h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1500 µg/mL	24h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2000µg/mL	24h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2500µg/mL	24h	25	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	48h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1000 µg/mL	48h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1500 µg/mL	48h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2000 µg/mL	48h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2500 µg/mL	48h	25	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	72h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1000 µg/mL	72h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1500 µg/mL	72h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2000 µg/mL	72h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2500 µg/mL	72h	25	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	96h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1000 µg/mL	96h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1500 µg/mL	96h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2000 µg/mL	96h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2500 µg/mL	96h	25	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0
500 µg/mL	120h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1000 µg/mL	120h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
1500 µg/mL	120h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2000 µg/mL	120h	25	50	25	0	0	50	25	0	0	0	0
2500 µg/mL	120h	25	50	50	0	0	50	50	0	0	0	0

A Tabela 6 representa a cultura do *S.mansoni* com o tratamento da partição hidroalcoólica do extrato da *M.piperita*. Onde foram observados 50% de separação dos casais nas concentrações de 1500 e 2000µg/mL em todos os períodos de tratamento, não foi observado separação nas outras concentrações e morte em todas as concentrações. Redução da atividade motora não significativa foi observada em 50% dos vermes machos na concentração de 2000µg/mL em 24 e 48 horas após o tratamento, redução significativa em 50% de machos e fêmeas foi observada em 1500 nos períodos de 72, 96 e 120 horas após o tratamento, 75% em machos e 50% em fêmeas observados em 2000µg/mL durante 72 e 96 horas e 100% na redução de atividade motora com 2000µg/mL durante 120horas de tratamento (Tabela 6).

**Tabela 6:** Efeito da partição Hidroalcoólica do extrato da *M. piperita* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Porcentagem de Casais Separados (%)	Porcentagem de Vermes Mortos (%)		Porcentagem de vermes com redução na atividade motora (%)				Porcentagem de vermes com alteração no tegumento (%)				
			M	F	Não significativa		Significante		Parcial		Extensivo		
					M	F	M	F	M	F	M	F	
Control <sup>a</sup>	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PZQ <sup>b</sup>	24	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidroalcoolic fraction of <i>M. piperita</i> (µg/mL)													
500	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	24h	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
500	48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	48h	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	48h	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0
500	72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	72h	50	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	0
2000	72h	50	0	0	0	0	75	50	0	0	0	0	0
500	96h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	96h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	96h	50	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	0
2000	96h	50	0	0	0	0	75	50	0	0	0	0	0
500	120h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	120h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	120h	50	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	0
2000	120h	50	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0

Como demonstrados na Figura 6, a partição FA e a partição FH apresentaram melhores resultados quando comparando com os resultados do extrato etanólico e com a partição FA do extrato da *M. piperita*.

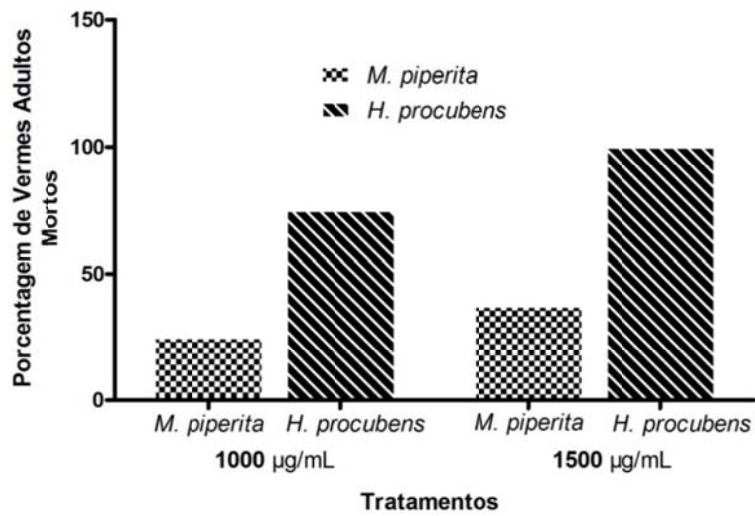


**Figura 6:** Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. e das partições na mortalidade do *Schistosoma mansoni*: Comparando os resultados obtidos nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml após 24h

#### **4.5 - Efeito do extrato etanólico de *Hapagophytum procumbens* sobre vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro***

O extrato etanólico da *H. procumbens* foi testado sobre o casal de verme adulto de *S. mansoni*, nas concentrações de 500µg/mL até 2500 µg/mL, em comparação com o controle utilizando somente o meio de cultura RPMI e controle utilizando meio RPMI com 10% de DMSO. Em 500µg/mL no período de 24h não apresentou alterações nos casais de vermes. Porém, na mesma concentração no período de 120 horas, foi demonstrado que 25% dos casais de vermes se separaram e 50% apresentaram diminuições não significativas da atividade motora (Tabela 7). Na contração de 1000µg/mL no período de 24h apresentou 100% dos casais separados, 75% mortos e 100% com atividades reduzidas (Tabela 7). A partir da concentração de 1000µg/mL por 120h até 2500µg/mL 120h (passando por período de 24 e 120 horas das concentrações), foram observados 100% dos casais separados, 100% dos casais com diminuição significativa da atividade motora e 100% dos casais mortos. Não foi observado alterações no tegumento em todas as concentrações (Tabela 7) com a técnica de microscopia optica.

Na Figura 7 é feita a comparação entre os resultados obtidos entre os extratos etanólicos das *M. piperita* e da *H. procumbens* na morte do *S. mansoni* após 24h de tratamento, com as contrações de 1000 e 1500 µg/ml após 24h.



**Figura 7:** Efeito do extrato etanólico da *Mentha piperita* L. e da *H. procumbens* na mortalidade de *Schistosoma mansoni*: Comparando os resultados obtidos nas concentrações de 1000 e 1500 µg/ml após 24h

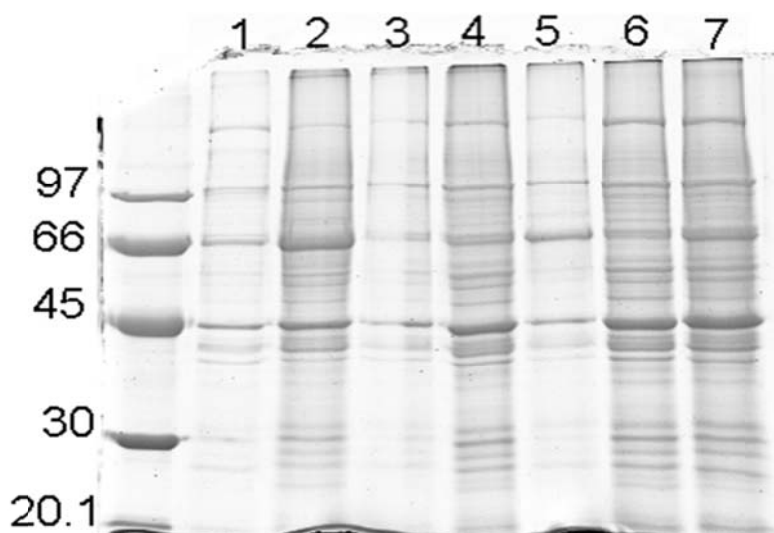


**Tabela 7:** Efeito do extrato etanólico da *H. procumbens* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Porcentagem relativa a 8 casais de parasitas.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Porcentagem de vermes separados (%)	Porcentagem de vermes mortos (%)		Porcentagem de verme com diminuição na atividade motora (%)				Porcentagem de vermes com alteração no tegumento (%)				
			M	F	Não signif		Significante		Parcial		Extensivo		
			M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
Controle (RPMI)	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMSO 10%	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato etanólico da <i>H. procumbens</i>													
500µg/mL	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	25	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0	0
1000µg/mL	24	100	75	75	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	120	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
1500µg/mL	24	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	120	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
2000µg/mL	24	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	120	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
2500µg/mL	24	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	120	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0

#### 4.6–Eletroforese em Gel SDS (1D)

Para avaliação dos efeitos dos extratos testados na proteômica do verme adulto de *S. mansoni*, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) em uma dimensão (1D), das amostras para verificação da qualidade da extração protéica. Foi utilizado 5 µl de cada amostra diluída em 15 µl de tampão de eletroforese sendo submetida a corrente elétrica limitada a 400 A e 120 v. Como demonstrado na Figura 8 a amostra não apresentou degradação do material ou contaminação de substâncias interferentes, demonstrando assim que foi obtido uma boa extração das amostras para a eletroforese bidimensional.



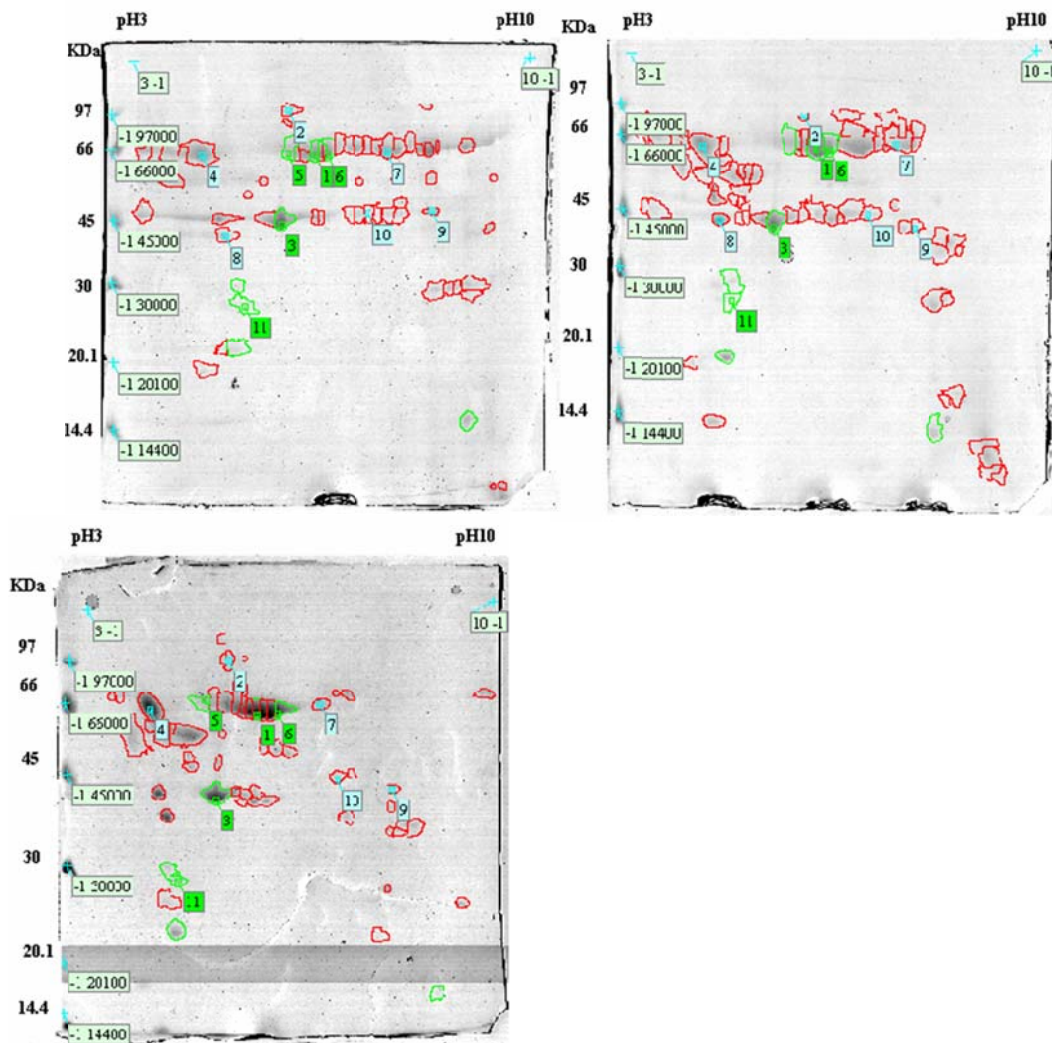
**Figura 8:** Gel da Eletroforese SDS-PAGE (1D) utilizado para verificar a qualidade da extração das proteínas de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* após os tratamentos: 1- Controle, 2 e 3– Extrato Etanólico da *M. piperita*, 4- Partição com Acetato de Etila, 5- Partição com Hexano, 6- Partição Hidro Alcoólica e 7 – Extrato Etanólica da *H. procumbens*.

## 4.7 - Eletroforese Bidimensional

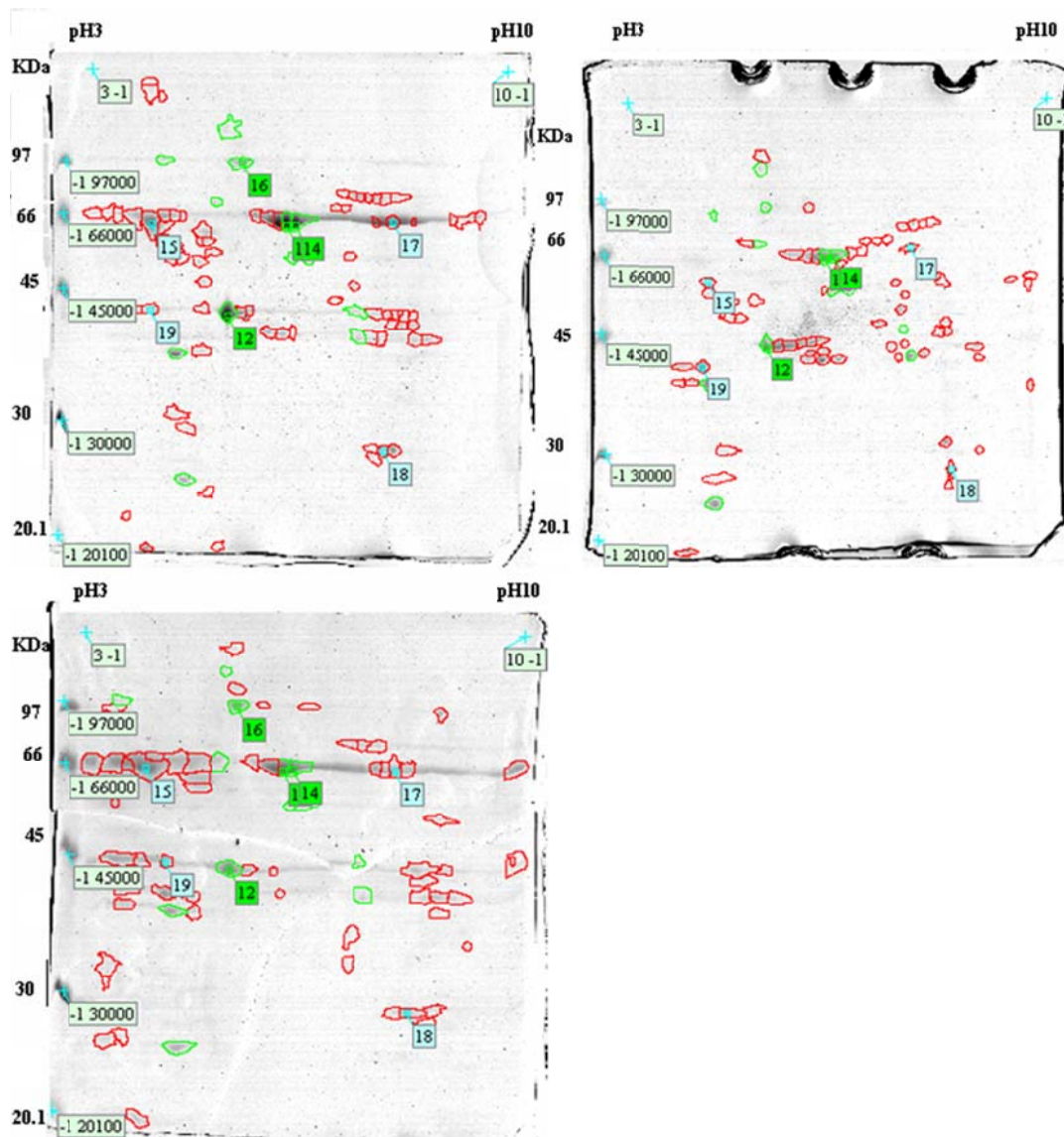
Foi possível observar diferenças nos números de spots nos géis com tratamento, tanto com os extratos etanólicos e com as partições da *M. piperita*, em comparação com o gel usado como controle (casais adultos de *Schistosoma mansoni* com o meio de cultura sem tratamentos). Devido o período de tempo entre os experimentos com os extratos etanólicos e as partições, foram feitos géis com o controle duas vezes, uma vez para comparação com os extratos etanólicos e a partição FHA, e outros géis controle para as partições FA e FH.

### 4.7.1 – Eletroforese Bidimensional com extratos etanólicos da *Mentha piperita* L. e da *Harpagophytum procumbens*

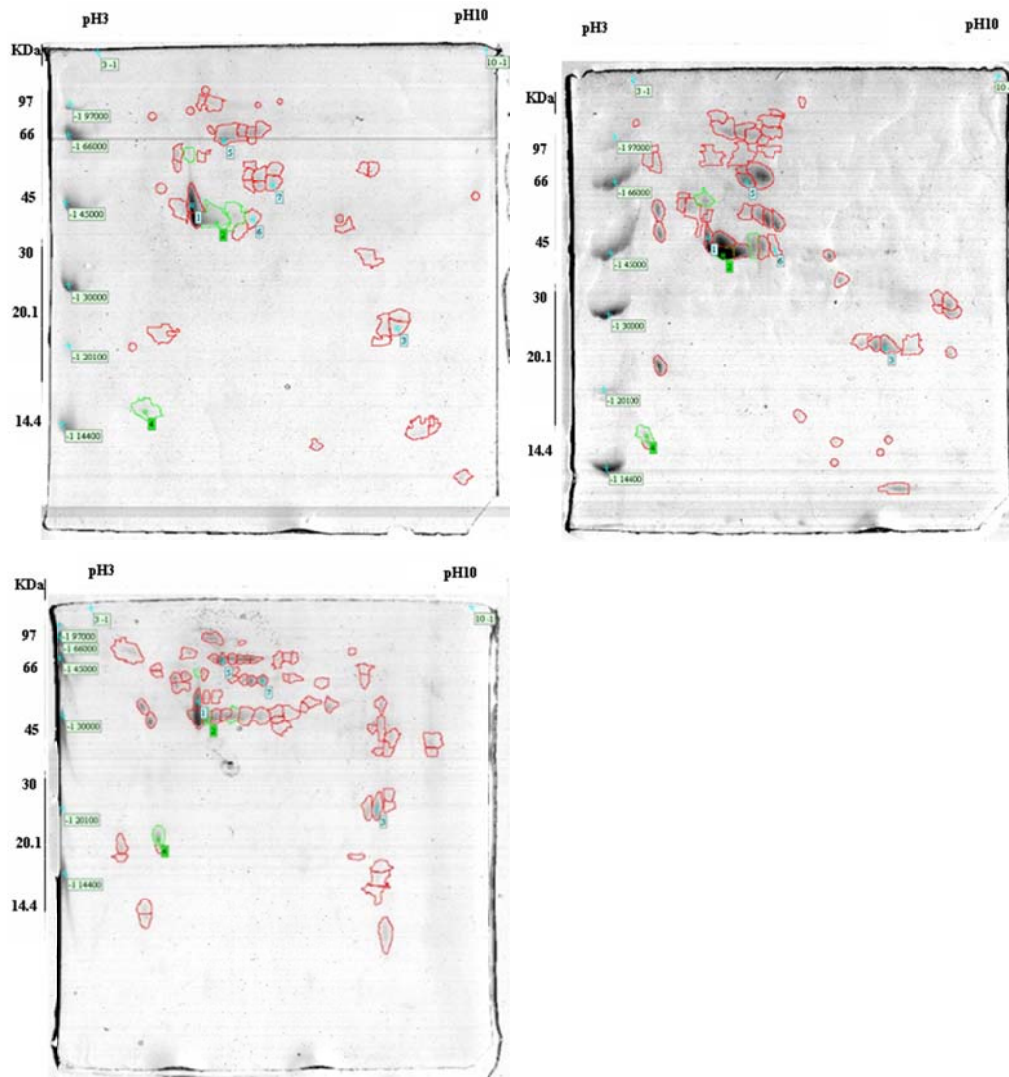
Para a segunda dimensão, foram empregados géis de poliacrilamida 10%, no qual os spots foram analisadas com *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). Como pode ser observado nos grupos tratados com extrato etanólico de *M. piperita* (Figura 9) e *H. procumbens* (Figura 11), cada amostra foi comparada com os géis controles que são representados pela figura 10 e pela figura 12, respectivamente para cada tratamento.



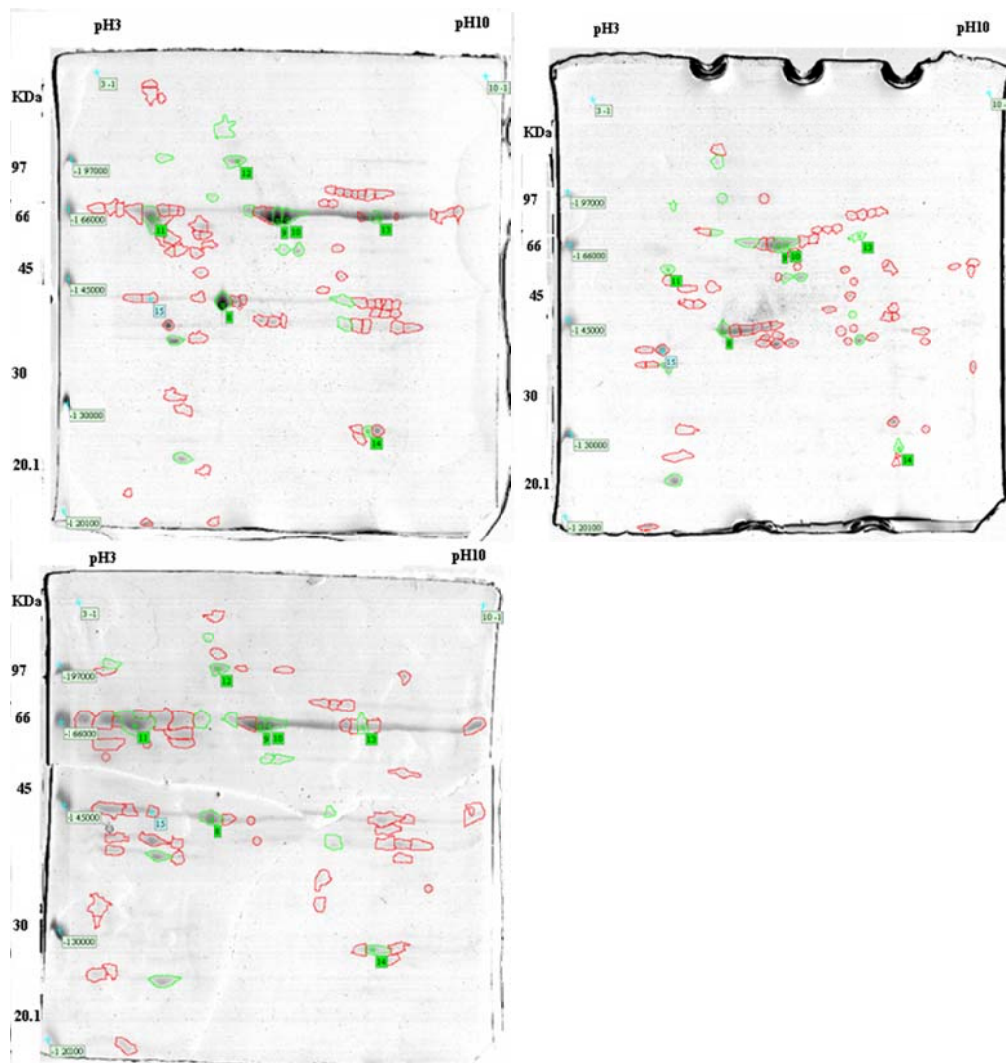
**Figura 9:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da planta *M.piperita* sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).



**Figura 10:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o *softwareImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).



**Figura 11:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml do extrato etanólico da planta *H. procumbens*, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).



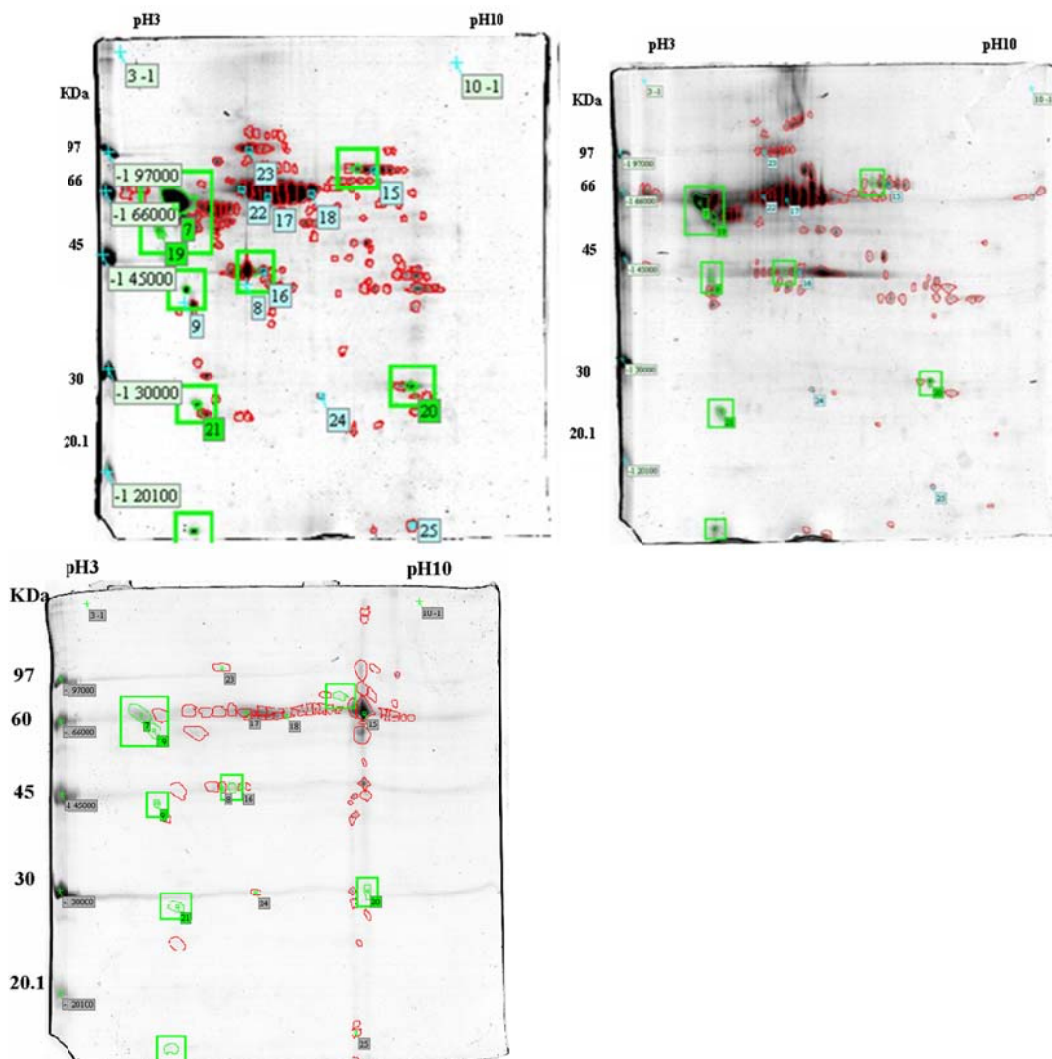
**Figura 12:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com extrato etanólico da *H. procumbens* analisado com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).

#### **4.7.2 – Eletroforese Bidimensional com partições FA e FH da *Mentha piperita* L**

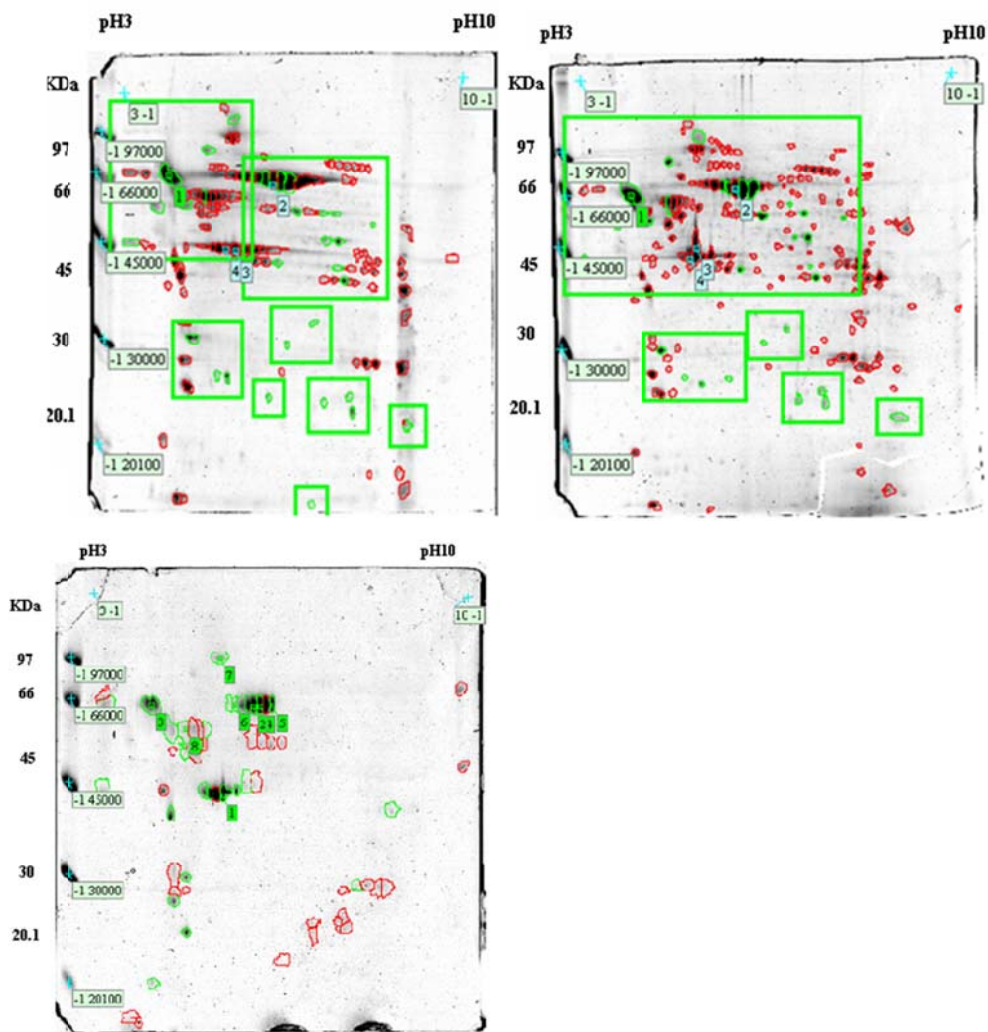
Igualmente aos grupos anteriores, a eletroforese bidimensional para as partições FA e FH da *M.piperita* foram usadas fitas de poliacrilamida de 13cm com o pH no intervalo de 3 a 10 não linear (3-10NL). Foram feitos géis controles para este grupo, diferente dos géis demonstrados para os extratos etanólicos.

Como observado na Figura 13 os géis com o tratamento com a FA da *M. piperita* apresentou *spots* com diferenças significativas e com os géis do controle (Figura 14). Para a identificação dos *spots* foi utilizando o *software ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare). Analisando as relações entre os *spots* presentes nos géis controle e os *spots* presentes nos géis do tratamento. Foram selecionados *spots* com valores abaixo de  $p < 0,05$ , avaliados pelo *software* utilizando o método de ANOVA.



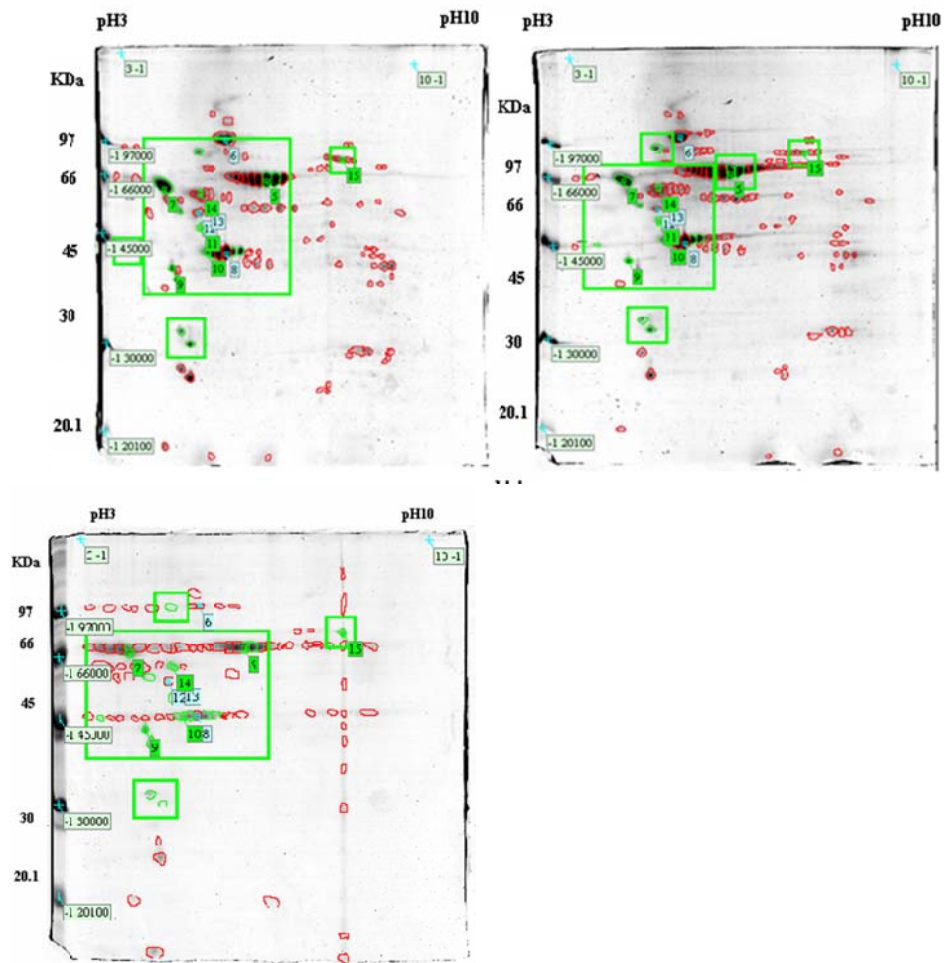


**Figura 13:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml com a partição FA do extrato etanólico da planta *M. piperita* sendo observados spots com diferenças significativas no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).

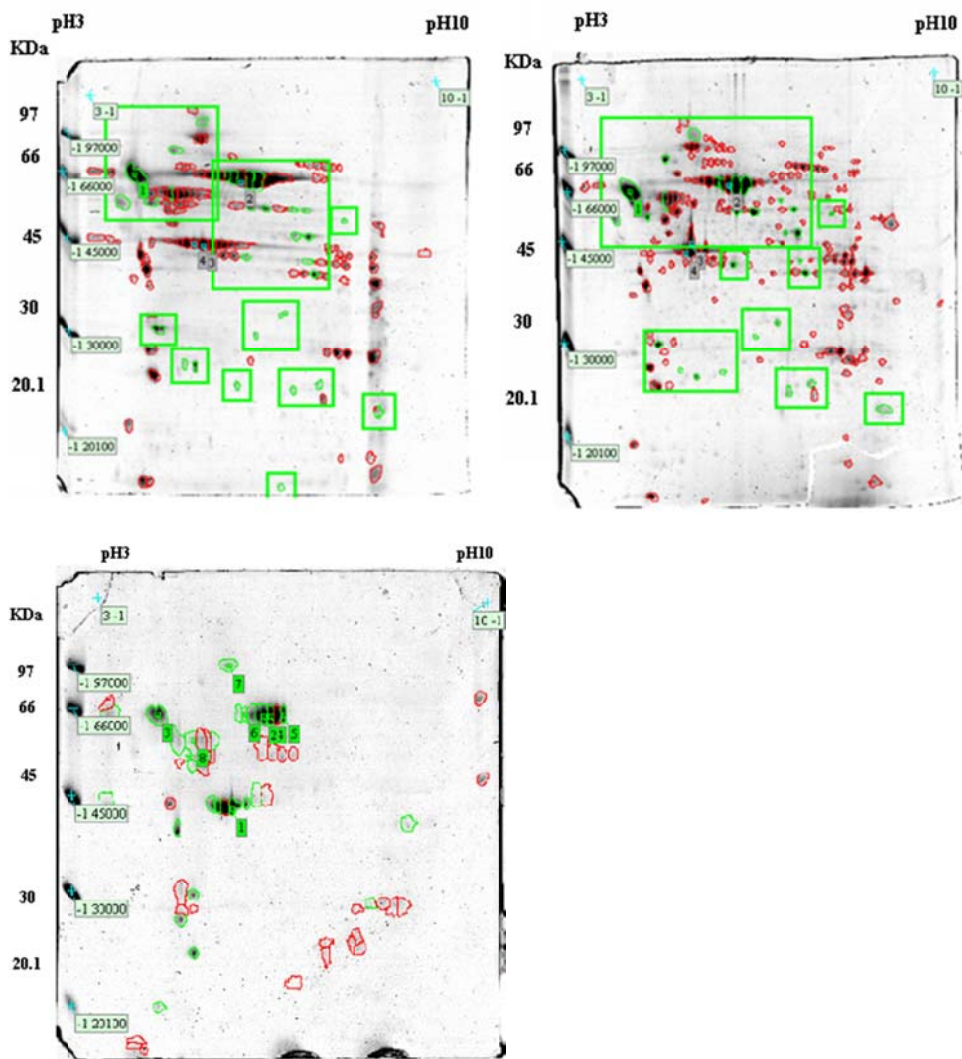


**Figura 14:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FA do extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).

Nos géis contendo tratamento com a partição FH da *M. piperita* foram selecionados apresentados diferenças significativas entre os spots presentes no gel com o tratamento e nos géis com o controle, sendo usado o software Platinum 7 e selecionados géis com  $p < 0,05$ . A Figura 15 representa os géis com o tratamento e a 16 os géis do controle.

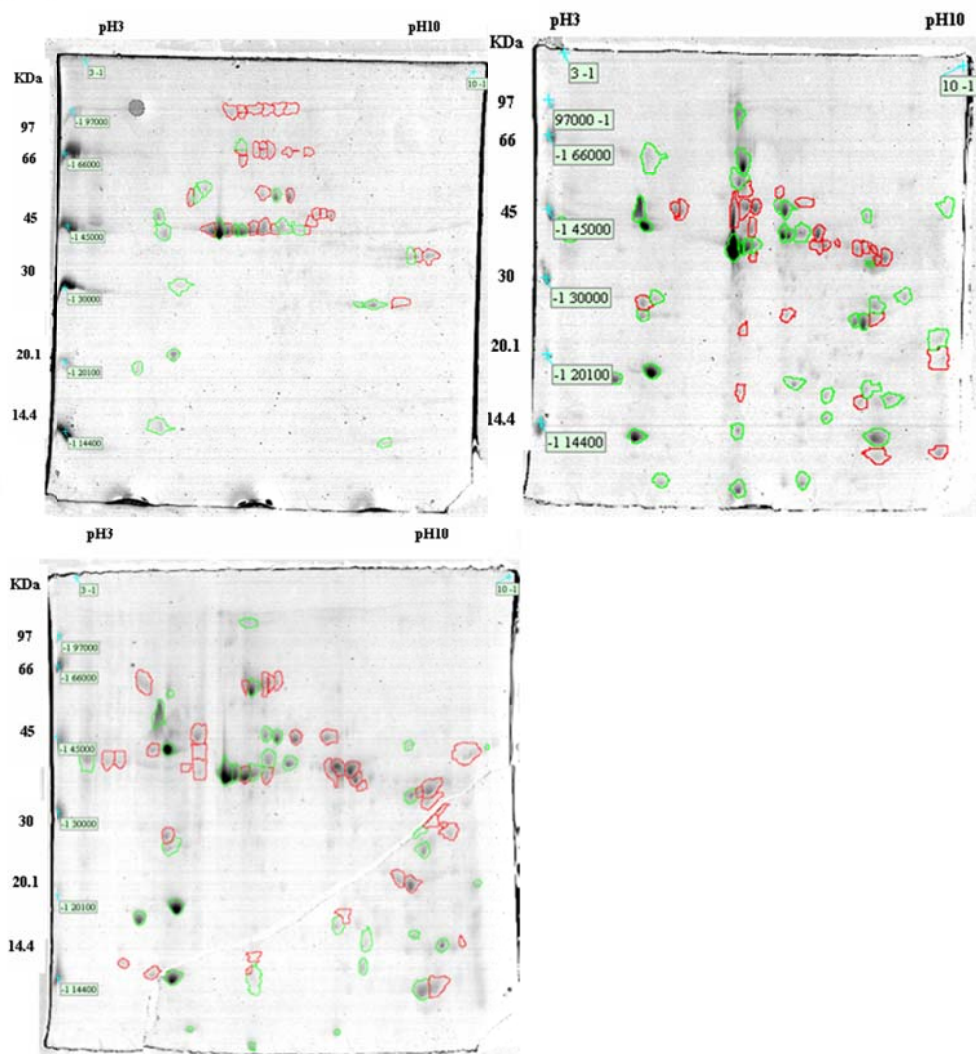


**Figura 15:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml com a partição FH do extrato etanólico da planta *M. piperita* sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).

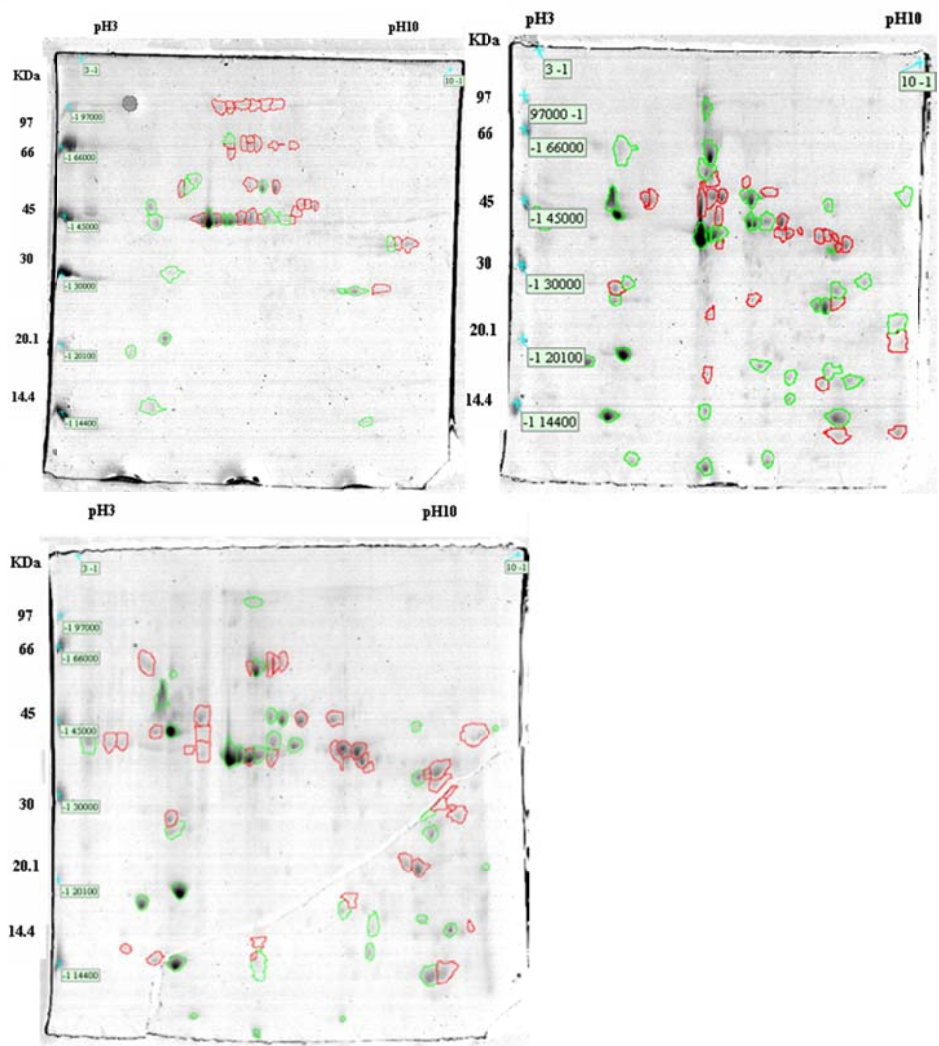


**Figura 16:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FH do extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).

A Figura 17 representa os géis contendo as proteínas do *Schistosoma mansoni* após tratamento com 1000 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da *Mentha piperita*. Os *spots* selecionados nos géis deste tratamento foram analisados com *Software ImageMaster Platinum 2D 7* apresentando diferença estatística de  $p < 0,05$  (ANOVA) com o grupo controle. A Figura 17 representa os géis do grupo tratado e a Figura 18 o controle comparando com o tratamento.



**Figura 17:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, com tratamento de 500 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da planta *M. piperita* sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo controle analisados com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).



**Figura 18:** Gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni*, grupo Controle, sendo observados spots com diferenças significantes no volume e concentração, feita estatística pelo método de Anova (marcados de verde), quando comparado com os géis do grupo trato com a partição FAH do extrato etanólico da *M. piperita* analisado com o software *ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare).



## 4.8 - Análises das proteínas por espectrometria de massas

### 4.8.1 – Análises das proteínas presentes nos spots dos géis com amostras após o tratamento dos extratos etanólicos da *Mentha piperita* L

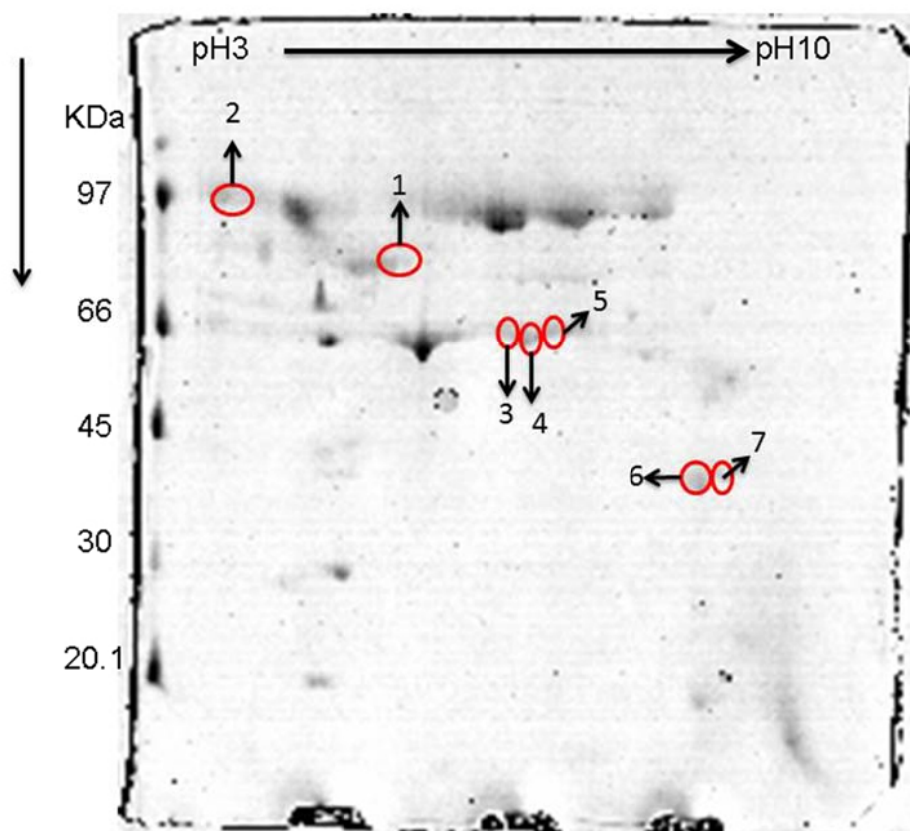
A espectrometria de massas foi realizada com *spots* encontrados no gel de eletroforese bidimensional contendo proteína do *S. mansoni* após tratamento com os diferentes extratos testados neste trabalho.

Depois da seleção dos *spots* foi realizado o recorte e em seguida a digestão dos géis, e posteriormente foi processado para realização da espectrometria de massas (MAS). Para este grupo foi utilizado como ionizador o ESI o analisador *ion trap Líneas-Orbitrap* (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific). Os dados obtidos pela espectrometria de massas foram analisados pelo *Software Proteome Discoverer 1.3* (Thermo Scientific), que relaciona os peptídeos encontrados nos spots com proteínas no banco de dados de *Schistosoma mansoni* do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Após esta análise a cadeia peptídica das proteínas identificadas foram comparadas com o banco de dados da UniProt/Swiss Prot (Universal Protein Resource), utilizando a ferramenta *Blast* no site da NCBI.

Não foi possível a identificação das proteínas nos *spots* que apresentaram diferença significativas (dados apresentados pelo *Software ImageMaster Platinum 2D 7* - GE healthcare) após análises dos espectros com *software Proteome Discoverer 1.3*. Por outro lado, conseguimos a identificação de spots, porém estes spots não apresentaram diferenças significativas. Dos spots analisados foi possível a identificação de 7 *spots* do grupo com tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da *M. piperita*. Como pode ser observado na Tabela 8, dos 7 *spots* foi possível a identificação de 8 proteínas, a Figura 19 representa os *spots* que foram feitas as identificações. Não foi possível identificar as proteínas dos *spots* selecionados no gel do grupo controle.

**Tabela 8:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas dos spots no gel com tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da *M. piperita*.

<b>Spot</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Acesso para Uniprot</b>	<b>Massa teórica (Da) UniProt</b>	<b>Massa (Da) Gel</b>	<b>E-value</b>	<b>Score Proteome Discoverer</b>
1	Actina -1	ACT1_SCHMA	41.732	55.596	2e-135	84,18
2	Paramiosina	MYSP_SCHMA	100.388	65215	1e-128	85,15
3	Actina -1	ACT1_SCHMA	41,732	43.120	2e-135	400,48
4	Actina -2	ACT2_SCHMA	41,741		4e-122	225,91
	Actina -1	ACT1_SCHMA	41,732		2e-135	188,20
5	Actina -1	ACT1_SCHMA	41,732	46.583	2e-235	65,81
6	Glutaciona S-transferase classe-mu 28 kDa isoenzima	GST28_SCHMA	23,820	24.813	2e-158	223,87
7	Glutaciona S-transferase classe-mu 28 kDa isoenzima	GST28_SCHMA	23,820	25.616	2e-158	84,18



**Figura 19:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 800 µg/ml do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap.

#### **4.8.2 – Identificação das proteínas presentes nos spots dos géis com tratamento com partição de acetato de etila (FA), partição de hexano (FH) e partição hidro alcoólica (FHA) do extrato etanólico da *Mentha piperita* L.**

As análises de espectrometria das partições da *M.piperita* foram feitas com os spots apresentando diferenças significativas entre os tratamentos e os controles. Também, foram selecionados spots nos géis controle, comparando os spots com os géis com tratamento. Os spots foram observados utilizando o *Software ImageMaster Platinum 2D 7*, fazendo a estatística para razões entre os géis utilizando o método ANOVA como demonstrado anteriormente. Da mesma forma, com o grupo controle, os spots selecionados foram recortados e foi feita a digestão dos géis utilizando enzima tripsina. Após a realização da espectrometria de massa os resultados de cada spot foram processados pelo software Mascot, programa que faz umas buscas em banco de dados selecionado identificando possíveis proteínas com base na cadeia peptídicas identificadas em casa spots.

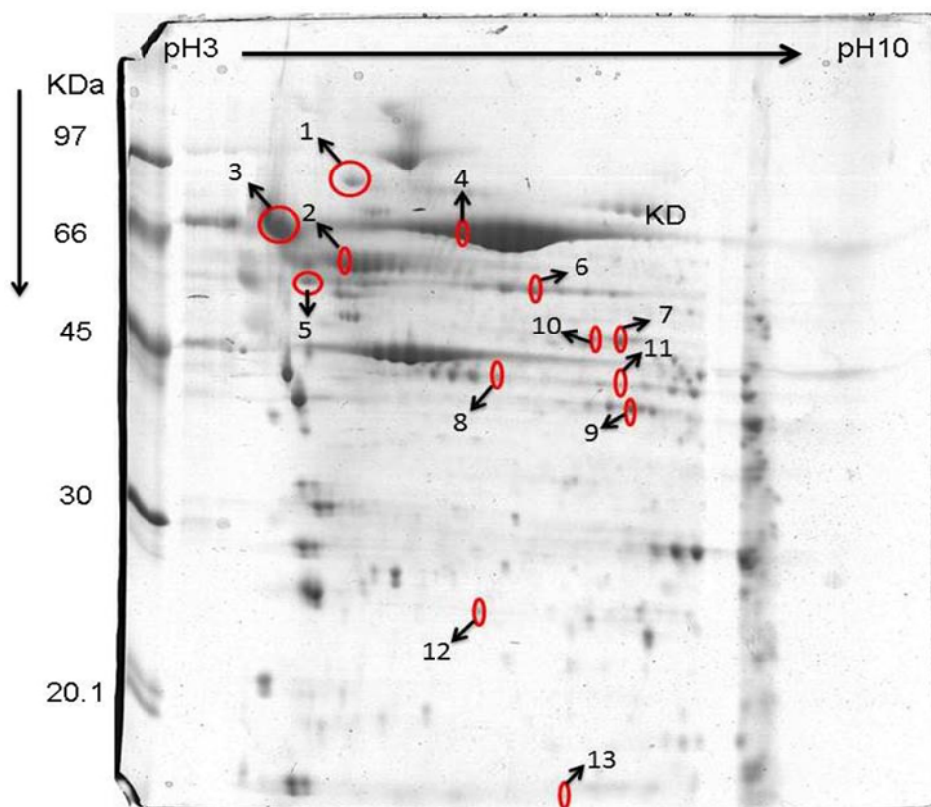
Para as análises utilizando o programa Mascot para as partições FA e FH e para a partição FHA foi utilizado o software *Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific)*. Foi utilizado o banco de dados *Schistosoma mansoni* da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Porém, os peptídeos identificados por este programa foram analisados no banco de dados de proteínas do e do UniProt/Swiss Prot (*Universal Protein Resource*), utilizando a ferramenta BLAST presente no site da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As análises feitas nestes bancos de dados servem para verificar se as proteínas encontradas pelo *Mascot* estão corretas e analisar com maior precisão, uma vez que no banco de dados da NCBI varias proteínas eram identificadas como “*putative*”. Foram selecionadas como corretas as proteínas que obtiveram o score superior indicado no *Mascot* e as proteínas que obtiveram score *e-value* superior a  $1e^{-06}$  no Blast (banco de dados da UniProt).

Após estas análises as proteínas identificadas e analisadas nos bancos de dados, foram identificadas 13 *spots* no gel controle quando comparado com o grupo tratado com partição FA, apresentando 18 proteínas identificadas nestes spots, como demonstrado na Tabela 9. Os *spots* identificados estão marcados na Figura 20. E apenas 7 spots, sendo identificado 9 proteínas (Tabela 10). Na Figura 21 indica os *spots* identificados no gel com tratamento FA do extrato etanólico da *M. piperita*.

**Tabela 9:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel controle, comparada com tratamento com 500 µg/ml da partição FA do extrato etanólico da *M. piperita*.

Spot	Proteínas	Acesso para Uniprot	Massa teórica (Da) Uniprot	Massa (Da) no Gel	MASCOT Score	E-value
1	Paramiosina	MYSP_SCHMA	100.388	/8.0184	228	3e-17
2	Paramiosina	MYSP_SCHMA	100.388 /	57.207	2273	3e-29
3	Dissulfeto isomerase proteína – Precursora (erp60)	ERP60_SCHMA	54.306 /	64.583	124	2e-18
4	Proteína de choque térmico 70, homóloga, (HSP70)	HSP70_SCHMA	69.875 /	62.794	312	2e-13
5	Calreticulina Antígeno maior do ovo (P40)	CALR_SCHMA P40_SCHMA	45.398 39.428	54.289	145 30	1e-19 2e-23
6	Enolase	ENO_SCHMA	46.995	52.718	422	6e-20
7	Enolase Antígeno maior do ovo (P40)	ENO_SCHMA P40_SCHMA	46.995 39.428	44.697	1765 102	7e-14 3e-24
8	Frutose bifosfato aldolase	ALF_SCHMA	39.645	41.096	36	3e-13
9	Antígeno maior do ovo (P40)	P40_SCHMA	39.428	38.005	1319	2e-19
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	G3P_SCHMA	36.378		87	2e-14
10	Enolase	ENO_SCHMA	46.995	45.173	909	9e-21
11	Frutose bifosfato aldolase	ALF_SCHMA	39.645	40.349	322	4e-23
	Antígeno de tegumento(SmA22.6)	TEGU_SCHMA P40_SCHMA	22.578 39.428		44 36	5e-06 7e-11
	Antígeno maior do ovo (P40)					
12	Antígeno de tegumento(SmA22.6)	TEGU_SCHMA	22.578	23.941	478	5e-07
13	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	SODC_SCHMA	15.721	15.999	15869	7e-12

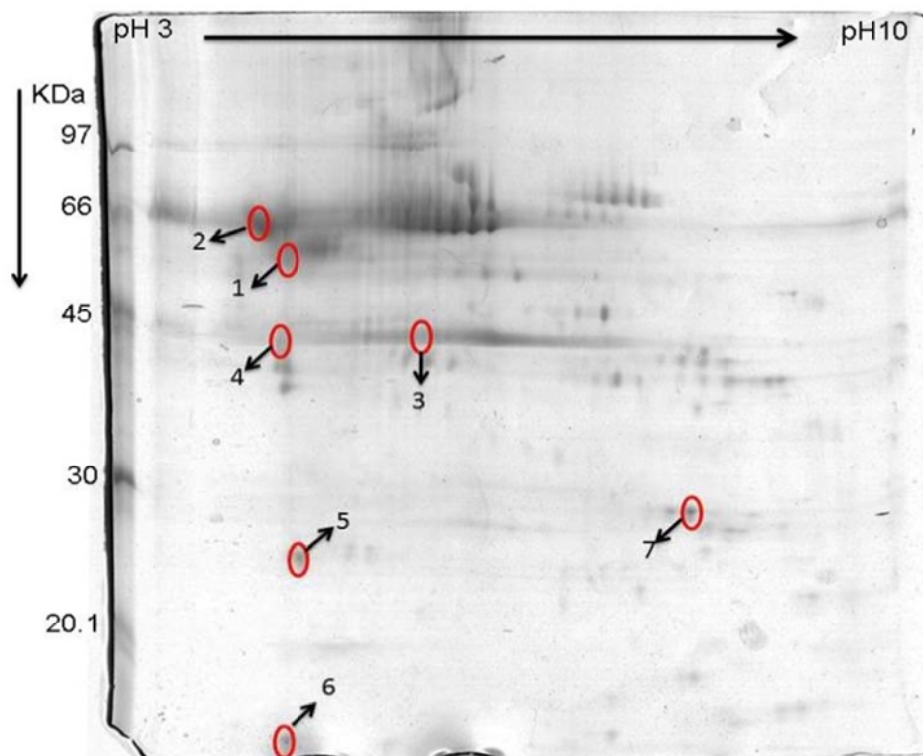


**Figura 20:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* grupo Controle comparado com tratamento da partição FA do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas qTOF.

**Tabela 10:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml da partição FA do extrato etanólico da *M. piperita*.

<b>Spot</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Acesso para Uniprot</b>	<b>Massa teórica (Da) Uniprot</b>	<b>Massa (Da) no Gel</b>	<b>MASCOT Score</b>	<b>E-value</b>
1	Calreticulina	CALR_SCHMA	45.398	51.950	50	2e-10
2	Tropomiosina-2	TPM2_SCHMA	32.696	60.153	82	2e-06
3	Actina-2 Proteína 14-3-3, homóloga 1	ACT2_SCHMA 14331_SCHMA	41.741 28.372	42.223	1746 51	1e-15 2e-15
4	Tropomiosina-2	TPM2_SCHMA	32.696	39.689	2424	6e-24
5	Proteína 14-3-3, homóloga 1 Proteína 14-3-3, homóloga 2	14331_SCHMA 14332_SCHMA	28.372 24.608	26.041	1482 181	4e-21 1e-06
6	Glutathiona S-transferase 28KDa	GST28_SCHMA	23.820	27.993	976	6e-12
7	Proteína 14-3-3, homóloga 1	14331_SCHMA	28.372	15.813	411	5e-14



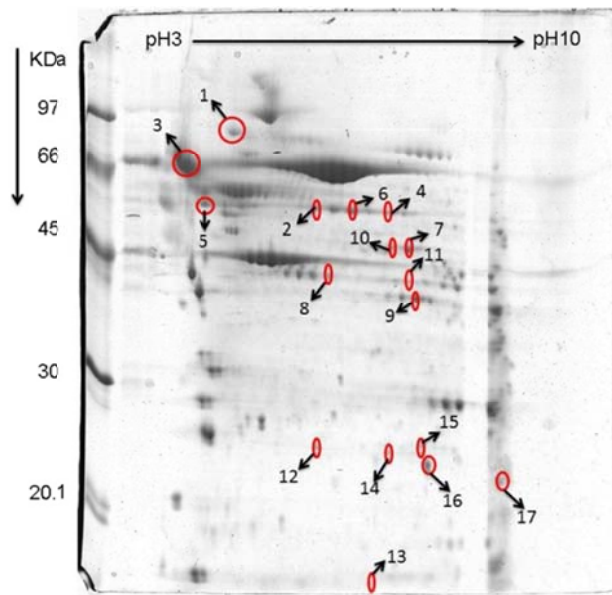


**Figura 21:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 500 µg/ml da partição FA extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas qTOF.

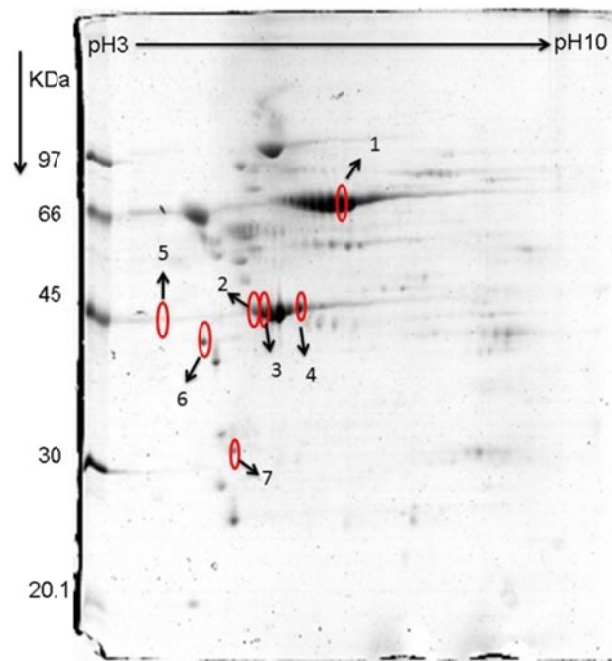
Após as análises foram identificados 17 *spots* no controle (Figura 22), quando analisado com o grupo tratado com partição FH, estes *spots* apresentaram 22 proteínas identificadas (Tabela 11). No gel com tratamento da partição FH foram identificados 7 *spots* com, destes *spots* foram identificadas 10 proteínas como mostra na Tabela 12 e na Figura 23

**Tabela 11:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel controle, comparadas com tratamento com 500 µg/ml da partição FH do extrato etanólico da *M. piperita*.

Spot	Proteínas	Acesso para Uniprot	Massa teórica (Da) Uniprot	Massa (Da) no Gel	MASCO T Score	E- value
1	Paramiosina	MYSP_SCHM A	100.388	80.184	228	3e-17
2	Antígeno Sm21.7	SM21_SCHM A	21.689	53.124	378	4e-13
3	Dissulfeto isomerase proteica Precursora (erp60)	ERP60_SCHMA	54.306	64.583	124	2e-18
4	Dissulfeto isomerase (ER-60)	ERP60_SCHMA	54.306	52.383	200	4e-19
5	Calreticulina Antígeno maior do ovo (P40)	CALR_SCHM A	45.398 39.428	54.289	145 30	1e-19 2e-23
6	Enolase	P40_SCHMA ENO_SCHMA	46.995	52.718	422	6e-20
7	Enolase Antígeno maior do ovo (P40)	ENO_SCHMA P40_SCHMA	46.995 39.428	44.697	1765 102	7e-14 3e-24
8	Frutose bifosfato aldolase	ALF_SCHMA	39.645	41.096	36	3e-13
9	Antígeno maior do ovo (P40)	P40_SCHMA	39.428	38.005	1319	2e-19
	Gliceraldeído - 3-fosfato desidrogenase	G3P_SCHMA	36.378		87	2e-14
10	Enolase	ENO_SCHMA	46.995	45.173	909	9e-21
11	Frutose bifosfato aldolase	ALF_SCHMA	39.645	40.349	322	4e-23
	Antígeno de tegumento(SmA 22.6)	TEGU_SCHM A	22.578		44	5e-06
	Antígeno maior do ovo (P40)	P40_SCHMA	39.428		36	7e-11
12	Antígeno de tegumento (SmA22.6)	TEGU_SCHM A	22.578	23.941	478	5e-07
13	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	SODC_SCHM A	15.721	15.999	15869	7e-12
14	Antígeno de tegumento	TEGU_SCHM A	22.578	23.526	581	4e-09
15	Antígeno de tegumento	TEGU_SCHM A	22.578	24.004	47	2e-08
16	Antígeno Sm21.7	SM21_SCHM A	21.689	22.658	824	1e-12
17	Enolase	ENO_SCHMA	46.995	21.556	221	1e-20



**Figura 22:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* grupo Controle comparado com tratamento da partição FH do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas qTOF.



**Figura 23:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 500 µg/ml as partição FH do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas qTOF.

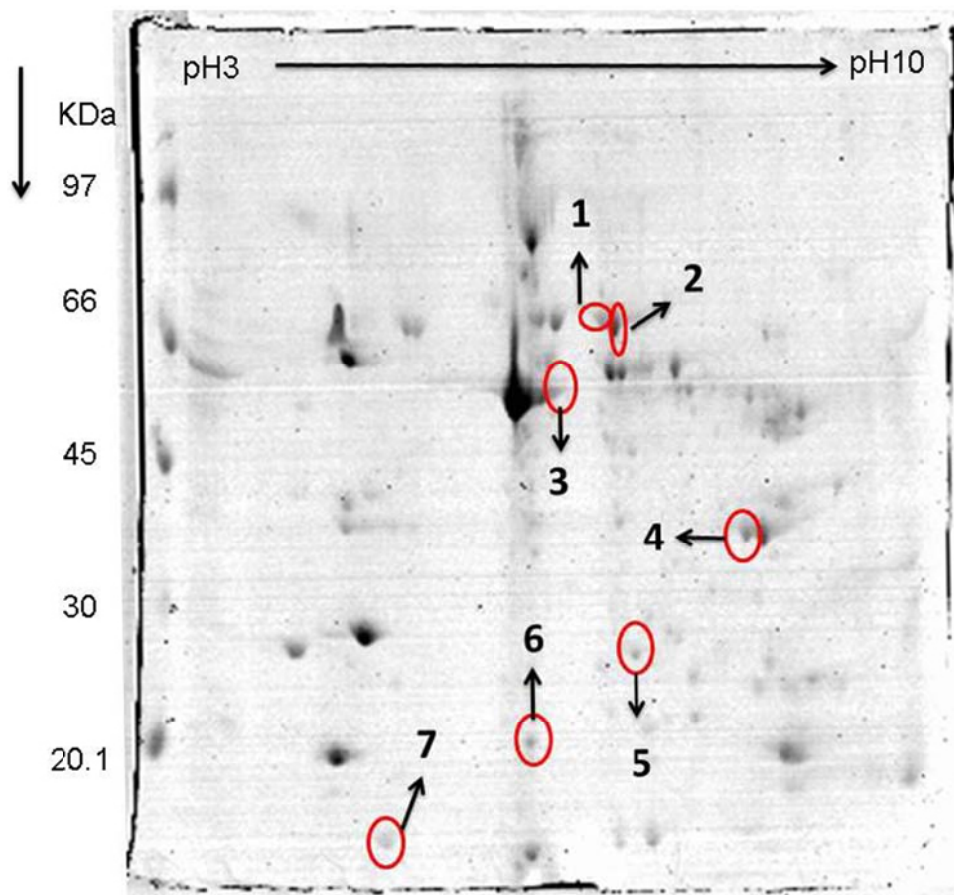
**Tabela 12:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml da partição FH do extrato etanólico da *M. piperita*.

Spot	Proteínas	Acesso para Uniprot	Massa teórica (Da) Uniprot	Massa (Da) no Gel	MASCOT Score	e- value
1	Actina -2	ACT2_SCHMA	41.741	63.077	158	6e-21
2	Actina 1	ACT1_SCHMA	41.732	41.811	120	2e-10
3	Actina-2 Actina-1	SCT2_SCHIMA SCT1_SCHIMA	41.,741 41.,732	41.553	75 394	2e-16 2e-16
4	Actina2 Proteína 14-3-3, homóloga 2	ACT2_SCHMA 14332_SCHMA	41.,741 24.,608	41.908	1389 798	7e-18 4e-11
5	Tropomiosina – 2	TPM2_SCHMA	32.696	42.103	97	4e-09
6	Tropomiosina – 2	TPM2_SCHMA	32.,696	39.392	2685	8e-24
7	Actina-2  Tropomiosina-1	SCT2_SCHIMA  TPM1_SCHMA	41.,741  32.,954	29.713	1565  596	3e-17  1e-21

Ao comparar os géis com a partição FHA da *Mentha piperita* com o gel controle utilizando o *software ImageMaster Platinum 2D 7* (GE healthcare) foi possível a identificação de 9 *spots* com diferença significativa entre os valores dos *spots*. Porém, ao fazer análise da espectrometria de massas como o equipamento *ion trap Líneas-Orbitrap* (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific) e posterior análises dos espectros com *software Proteome Discoverer 1.3* (Thermo Scientific) e análises nos bancos de dados, não foi possível a identificação de proteínas nestes *spots*. Por outro lado, foi possível a identificação de proteínas de outros *spots*, porém, assim como ocorrido com a amostra dos géis do extrato etanólico da *M. piperita*, estes géis não apresentam diferenças ao comparar com os géis do grupo controle. Os *spots* marcados podem ser vistos na Figura 24 e a identificação das proteínas na tabela 13.

**Tabela 13:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 1000 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da *M. piperita*.

<b>Spot</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Acesso UniProt</b>	<b>para</b>	<b>Massa teórica (Da) UniProt</b>	<b>Massa (Da) Gel</b>	<b>E-value</b>	<b>Score</b> <i>Proteome Discoverer</i>
1	Paramiosina	MYSP_SCHMA		100.388	45.391	1e-128	74,55
2	Paramiosina	MYSP_SCHMA		100.388	44.489	1e-128	79,07
3	Actina-2	ACT2_SCHMA		41.741	36.429	4e-24	331,50
4	GlutathioneS-transferase class-mu 28 kDa isozyme	GST28_SCHMA		23.820	23.859	2e-158	145,72
5	Actina-1	ACT1_SCHMA		41,732	17.370	1e-18	70,00
6	Superoxido dismutase [Cu-Zn]	SODC_SCHMA		15,721	13.814	3e-110	160,90
7	Antígeno 21.7	SM21_SCHMA		21.689	11.649	7e-140	92,77



**Figura 24:** Spots identificados no gel bidimensional de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 1000 µg/ml da partição FHA do extrato etanólico da *Mentha piperita*, spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap.



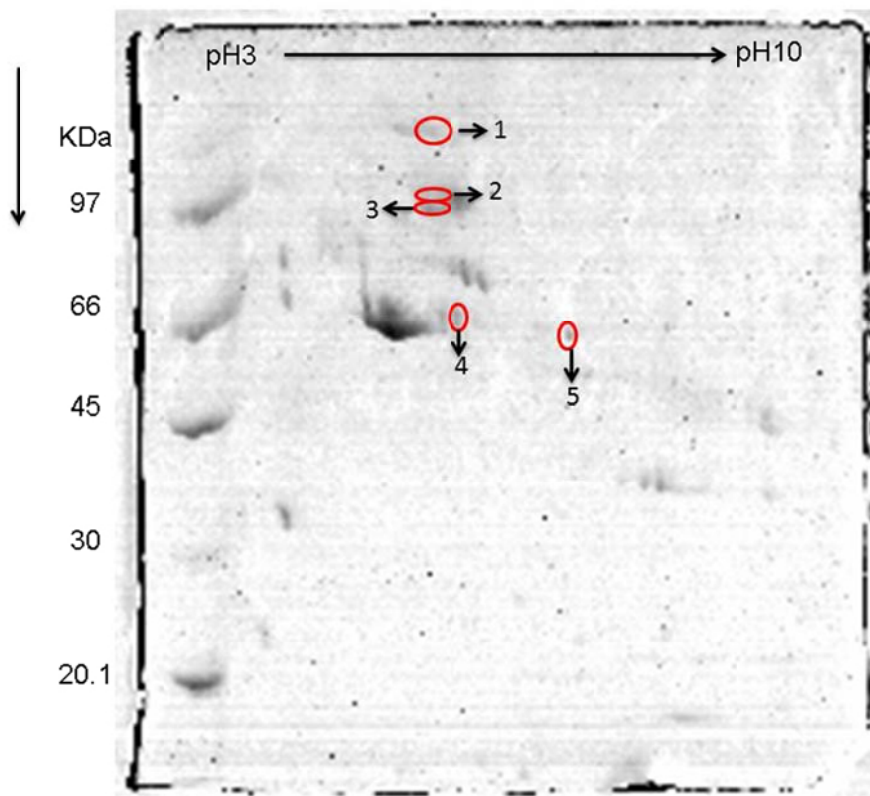
#### 4.8.3 – Identificação das proteínas presentes nos spots dos géis com tratamento com partição do extrato etanólico da *Hargophytum procumben*

Assim como, na identificação dos *spots* do extrato etanólico da *M.piperita*. Os *spots* deste grupo também foram analisados pelo *ion trap Líneas-Orbitrap* (LTQ *Orbitrap Velos, Thermo Scientific*). E dos dados obtidos pelo espectrômetro de massas foram analisados pelo *software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific)*, fazendo a identificação por peptídeos no banco de dados específico para *S. mansoni* do NCBI. Dessa forma, os peptídeos encontrados foram analisados por *Blast* comparando com o banco de dados para *S. mansoni* da UniProt/Swiss Prot.

Assim, como no grupo tratado com extrato etanólico e com a partição FHA da *M.piperita*, não foi possível a identificação das proteínas com diferença significativa. Porém foi possível a identificação de 5 *spots* que não consta com diferença significativa após análises com *software ImageMaster Platinum 2D 7*, fazendo a estatística para razões entre os géis utilizando o método ANOVA como demonstrado anteriormente. Como podem ser observadas na Tabela 14 as proteínas identificadas e na Figura 25 os *spots* utilizados para a identificação. Não foi possível a identificação dos *spots* presentes no grupo controle, porém, os géis com tratamento do extrato etanólico da *H.procumbens* foi comparado nas análises anteriores a espectrometria de massas, utilizando o *software ImageMaster Platinum 2D 7*.

**Tabela 14:** Proteínas do *S. mansoni* identificadas no gel com tratamento com 500 µg/ml do extrato etanólico da *H procumbens*.

<b>Spot</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Acesso UniProt</b>	<b>para</b>	<b>Massa teórica (Da)</b>	<b>Massa (Da)</b>	<b>E-value</b>	<b>Score</b>
				<b>UniProt</b>	<b>Gel</b>		<b><i>Proteome Discoverer</i></b>
1	Paramiosina	MYSP_SCHMA		100.388	99.544	1e-127	62,27
2	Paramiosina	MYSP_SCHMA		100.388	63.775	1e-127	161,46
3	Paramiosina	MYSP_SCHMA		100.388	67.731	1e-128	71,78
4	Enolase	ENO_SCHMA		46.995	53.495	2e- 32	89,02
5	Enolase	ENO_SCHMA		46.995	39.278	3e-31	312,37



**Figura 25:** Spots identificados no gel bidimensionais de extrato protéico de *Schistosoma mansoni* com o tratamento de 500 µg/ml do extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens*, spots identificados por espectrometria de massas ion trap Líneas-Orbitrap..

## 5. Discussão

Buscas por novos medicamentos, a partir de produtos da extração de plantas e seus metabolitos é uma prática que se remete ao início de nossa civilização, por meio do uso popular. Por outro lado, este conhecimento popular deve ser comprovado, sendo testada sua eficácia, juntamente com a toxicidade destas plantas (OLIVEIRA, 2012) e os seus possíveis alvos terapêuticos.

Neste trabalho foram demonstrados resultados no qual sugerem que, o extrato etanólico da *M. piperita* apresenta potenciais efeitos contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (*in vitro*), podendo apresentar efeito antihelmíntico. A partir da exposição *in vitro* dos vermes a concentração de 1000 µg/mL foi possível observar morte, separação de casais, redução na atividade motora de vermes adultos e alteração no oograma de ovos *S. mansoni* (Tabela 3). Estes resultados observados corroboram parcialmente com trabalhos anteriores, mostrando o efeito desta planta no controle da esquistossomose no modelo murino (DEJANI *et al*, 2014). Extrato metanólico da *M. piperita* apresentou atividade antihelmíntica contra *Pheretima posthuma* na dose de 20 mg/ml, demonstrando que foi compatível nas mesma concentração de Albendazol, causando paralisia e morte dos vermes (GIRME *et al*, 2006). KATIKI e colaboradores (2011), demonstraram que, óleo essencial da *M. piperita* apresentou efeitos contra *Haemonchus contortus* na concentração de 0,15 mg/ml. Também foram relatados resultados satisfatórios do óleo essencial desta planta no desenvolvimento de ovos de *Haemonchus contortus* (CARVALHO *et al*, 2012). Em nosso laboratório, foi observada diminuição de 35,2% no numero de vermes adultos de *S. mansoni* e também redução de números de ovos no intestino, fígado e nas fazes de camundongos, após tratamento com o extrato etanólico desta planta (DEJANI *et al*, 2014). Assim, estes dados juntamente com a literatura estudada sugerem que, a *M. piperita* apresenta efeitos antihelmínticos que precisam ser mais explorados, principalmente no que se refere à busca pelos alvos moleculares nesses parasitos.

Além de apresentar efeitos contra diversos organismos, nosso grupo demonstrou resultados promissores com o extrato etanólico da *M. piperita* em

concentrações abaixo do seu efeito citotóxico em fibroblastos (DEJANI, 2011). E ainda, TAVARES e colaboradores (2006) demonstraram que administração da *M. piperita* em indivíduos (voluntários sadios) não causou alterações no hemograma, não apresentou elevação no nível de sódio sérico, apesar de ter propriedades diuréticas; não ocorreu espoliação significativa de potássio e não afetou índices das enzimas hepáticas; também não foi relatado efeito de toxicidade crônica em humanos (MACKAY; BLUMBERG, 2006). Demonstrando assim que, a *M. piperita* não apontou efeitos de toxicidade sistêmica e nem foi capaz de promover morte celular quando em contato com organismos de mamíferos (TAVARES *et al*, 2006).

Das partições testadas obtidas por extração de solventes do extrato etanólico, partição FA, FH e FHA, demonstraram excelentes resultados, sendo que a FA (Tabela 4) demonstrou ser mais promissoras que as outras frações. Obtivemos melhores resultados na cultura de vermes adultos tanto com FA, quanto com a FH (Table 5), porém, a FHA se mostrou com baixo potencial antihelmintico (Tabela 6). Como demonstrado na Figura 6, comparando as frações com o extrato etanólico da *M. piperita*, onde pode ser observado que, em 500 µg/ml o extrato etanólico não causou morte dos vermes adultos, porém, com as partições FA e FH foram observadas morte dos vermes adultos de *S. mansoni* nesta mesma concentração. Os efeitos destas duas partições ainda se mostraram superior ao comparar na concentração de 1000 µg/ml, concentração na qual começou a ser observada morte dos vermes adultos com o extrato etanólico (Figura 6). Estudos anteriores demonstram a partição FA da *M. piperita* e de outras plantas com resultados mais eficientes e promissores, se comparado com as outras frações, sugerindo que nessa extração podem ter os principais princípios ativos dessa planta. Como eficácia contra *Faciola hepática* (FA da *Castela tortuosa*), além de, possuir melhor atividade antibacteriana e melhor antioxidante do que as outras partições, sendo a FH a segunda melhor partição nessas comparações (ARUMUGAM *et al*, 2010; MORENO; VALARDE; ACEVEDO, 2012). Foi demonstrado nestas partições maior nível de fenóis,  $54,00 \pm 4,74$  mg de fenóis para cada g de folha (ARUMUGAM *et al*, 2013). O que nos remete a importância dos fenóis no controle desses parasitas.

O efeito antihelmintico da *M. piperita* ainda é desconhecido, porém, folhas desta planta apresentam de 19 a 23% de polifenóis, e destes polifenóis apresenta 12% de flavonoides (MACKAEY; BLUMBERG, 2006). Compostos polifenólicos apresentam atividade antihelmíntica, e há a evidencia de que mentol (33-60% do óleo essencial) e mentona (15-32% do óleo essencial) tenham também efeito antimicrobiano (ISCAN *et al*, 2002; DEORE *et al*, 2009). Compostos fenólicos sintéticos, como niclosamida podem atuar em helmintos, interferindo na fosforilação oxidativa, afetando a geração de energia (JOHN *et al*, 2009). Os principais flavonoides encontrados na *M. piperita* são eriocitrina, narirutina, hesperidina, luteolina-7-O-rutinosida, que apresentam grande significância farmacologica (FECKA; KOWALCZYK.; CISSOWAKI 2004). Dessa forma a ação conjunta desses compostos pode ser responsáveis pela ação contra *S. mansoni*.

Ao comparar os dois extratos etanólicos testados neste estudo observaram que, obtivemos melhores resultados com o extrato da *H. procumbens* quando comparado com o extrato da *M. piperita*. Como podem ser observados nos resultados, em 500 µg/ml ambos os extratos não apresentaram efeitos, com 1000 µg/ml após 24 horas a *M. piperita* apresentou 25% dos vermes mortos contra 75% dos vermes mortos na mesma concentração e tempo de tratamento com a *H. procumbens* (Figura 7). Em 1500 µg/ml a *H. procumbens* apresentou morte de todos vermes adultos, enquanto que, a *M. piperita* apresentou morte de apenas 37,5%. (Figura 7).

A *H. procumbens* pode ser indicada para anorexia, indigestão, distúrbio musculares, anti-inflamatório (sugere a literatura esse efeito ao composto harpagosídeo), atrite, entre outras patologias (ROSA; MACHADO, 2007) Porém, estudos são poucos desta planta contra microrganismos ou parasitas. Em nosso laboratório foi demonstrado que tratamento em camundongos com 15mg/kg do extrato etanólico da *H. procumbens*, reduziu significativamente o numero de ovos de *Schistosoma mansoni* quando comparado com o grupo controle (dados não publicados). WECKESSE *et al* (2007) demonstrou que, extrato da *H. procumbens* inibiu o crescimento de todas as bactérias aeróbicas e de duas cepas de bactérias anaeróbicas testadas em seu estudo (como

*Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, entre outras,).

Os compostos ativos da *H. procumbens* são glicosídeos iridóides que constitui aproximadamente 3% de toda a planta, os glicosídeos presentes na planta são harpagosídeo, procumbídeo, harpagídeo, e 8-para-coumaroil-harpagídeo. Entre outros compostos como fenóis derivados do ácido cinâmico, ácido caféico, ácido clorogênico, flavonoides e  $\beta$ -sitosterol (LANHERS *et al*, 1992; GRANT *et al*, 2007). Assim, como na *M. piperita* a ação desta planta em microrganismos não é bem definida, porém, em estudos anteriores foi demonstrado efeitos do harpagídeo e harpagosídeo contra vírus do herpes tipo 1 e efeitos de diterpenos isolados da *H. procumbens* contra *Plasmodium falciparum* (MNCWANGI *et al*, 2012). Sugerindo assim que, estes compostos presentes na *H. procumbens* podem ter efeito antimicrobiano e possivelmente antiparasitário.

Durante a análise proteômica, observamos nos *spots* analisados após os tratamentos e no controle, as mesmas proteínas presentes, em mais de um *spot*, como pode ser observado nas Tabelas 8 até 14. A identificação das mesmas proteínas em mais de um *spot* pode ser causada por fatores como modificação pós-taducionais, isoformas de proteínas e degradação proteolítica (JORGE *et al*, 2005). Por isso, a importância da espectrometria de massas na identificação dessas proteínas.

Após as análises com a espectrometria de massas e a identificação das proteínas pelos bancos de dados específicos para *Schistosoma mansoni* foi possível identificar algumas proteínas importantes para a sobrevivência dos vermes adultos. Entre estas proteínas, em estudos anteriores, algumas foram relatadas como possíveis alvos para vacinas. Estas proteínas incluem glutathione s-transferase, fosfato isomerase (BERGQUIST, 1995), sm24 (sm21.7) que tem reconhecimento preferencial em camundongos infectados (FRANCIS; BICKLE, 1992), sma22.6 (DUNNE, *et al*. 1997, Webster *et al*, 1996), 70kDa (70KDa “heat shock protein” ou Hsp70) (KANAMURA *et al*, 2002), entre outras.

Nesse estudo, foi demonstrada a presença de enzimas glicolíticas em *spots* que se apresentaram diferentes entre controle e tratamentos, como a enolase (Tabelas 9, 11 e 14), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e frutose bifosfato aldolase (Tabelas 9 e 11). Enolase é uma enzima glicolítica, que pode desempenhar outras funções, homologa do inibidor de ATPase presente na mitocôndria, podendo atuar como proteína de ligação a nucleotídeos (DAVIS, 1993). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima importante na via glicolítica, que desempenha um papel crucial no catabolismo e anabolismo de carboidratos. Além de, seu papel enzimático esta proteína tem sido descrita como antígeno em vários microrganismos patogênicos, demonstrando um papel potencial como moléculas antigênicas e sendo forte candidata na incorporação de vacinas contra esquistossomose (SANTOS *et al*, 2012). Frutose-bifosfato aldolase, outra enzima glicolítica de grande importância para *S. mansoni* localizada no tegumento do *S.mansoni* e o antígeno SM21.7 demonstraram como potenciais candidatos para vacina (HARROP; COULSON; WILSON, 1999).

Também, foram observadas proteínas com grandes importâncias para recuperação e manutenção da homeostase em vermes adultos. Como calreticulina (Tabelas 9, 10 e 11), apresenta varias funções e é um a ligante de cálcio, que participa na manutenção da homeostase celular. Esta proteína pode agir como uma proteína chaperona, impedindo que proteínas erroneamente enoveladas sejam exportadas do reticulo endoplasmático para o complexo de golgi, podendo atuar também entre outras funções como uma lectina extracelular (MOURÃO, 2009). KHALIFE *et al* (1994) demonstraram que, em soro de camundongos infectados com *S. mansoni* foram encontrados anticorpos contra a proteína calreticulina, que interferiram na produção de ovos, sendo assim um possível alvo para uma vacina. Superóxido dismutase é uma enzima presente no citosol de células eucariótica e é responsável pela remoção de inúmeros radicais superóxidos, que são gerados por vários metabolismos oxidativos. HONG *et al* (1992) demonstraram que, esta enzima tem um papel importante na interação entre hospedeiro e verme de *S. mansoni*, e se acredita que, esta enzima tenha uma atividade importante contra sistema imune do hospedeiro. Foram identificadas proteínas com atividade na



movimentação do verme (YANG *et al.*, 1999) como actina, paramiosina e tropomiosina (Tabelas 8 até 14). Actina, proteína que está presente nas áreas de recuperação de danos, que implica um papel importante na reparação do tegumento, desenvolvendo assim um papel importante para o verme adulto de *S. mansoni* (MATSUMOTO *et al.*, 1988).

Entre outras proteínas, foram identificadas também proteínas que apresentam grande importância para a sobrevivência do verme adulto, que apresentam como possíveis alvos terapêuticos como a glutathione S-transferase, proteína 14-3-3 e proteínas de choque térmico (Tabelas 10 e 12).

A proteína Glutathione S-transferase (Sm28-GST) é uma proteína antigênica que é apontada como candidata a vacina contra *S. mansoni* (COMOY; CAPRON; THYPHRONITIS, 1998), uma particularidade é que é mais abundante nas fêmeas (GOBERT; STENZEL; MCMANUS, 1998). Em imunização com Sm28-GST pode ser gerada respostas imunes, tanto Th2 quanto Th1, dependendo do adjuvante empregado na imunização (COMOY; CAPRON. THYPHRONITIS *et al.*, 1998). Durante todo o ciclo do *S. mansoni* é observado a presença do antígeno 28-KDa (glutathione s-transferase - GST), e é encontrado uma quantidade significativa de anticorpos contra este antígeno em infecções. Esta enzima tem a função de catalisar a conjugação da glutathione com agentes tóxicos, como produtos da atividade de espécie reativa de oxigênio ou hidrocarboneto aromático policíclico (STRANGE *et al.*, 2001). A proteína 14-3-3, proteína exerce a função de se ligar em proteínas alvos, podendo atuar como reguladora de atividade ou sequestradora de proteínas e esta envolvida na maioria das principais atividades bioquímicas (MCGONIGLE; LOSCHIAVO; PEARCE, 2002). Após infecção de camundongos com proteína da família da proteína 14-3-3 se *Schistosoma japonicum* ZHANG (2001) encontrou significativa resposta celular Th1 e imunoglobulina G (IgG) específica anti *S. japonicum*.

Além de apresentar identificação das proteínas 14-3-3, Proteínas de choque térmico e antígeno de tegumento podem ser de importância, pois as proteínas secretadas e expressas na superfície do parasito são alvos promissores (WILSON *et al.*, 2004) Tanto em animais infectados quanto em seres humanos

a proteína de choque térmico de 70kDa (70KDa “*heat shock protein*” ou Hsp70) de *Schistosoma mansoni* é tida como um dos antígenos mais imunogênicos (KANAMURA *et al*, 2002). Estudos demonstraram que, a classe da Hsp70 é uma das classes de proteínas mais abundantes em todos os organismos vivos, tanto eucariontes como procariontes (KAUFMANN, 1990; KANAMURA *et al*, 2002). Diversos estresses metabólicos como exposição ao calor, metais pesados venenos metabólicos e outros, faz com que ocorra maior expressão dos genes destas proteínas, fazendo com que tenha um acúmulo das Hsp no organismo (MEYER; SILVA, 1999).

Os experimentos com o extrato etanólico e suas partições da *Mentha piperitae* o extrato etanólico da *H. procumbens* demonstraram diferenças entre *spots* detectados nos géis controle e tratamentos. Como mostrado anteriormente, foi possível a identificação de uma series de proteínas que em estudos anteriores apresentaram respostas imunológicas de hospedeiros infectados com *S. mansoni*. Por tanto, com este estudo pode ser sugerido que, os tratamentos dos extratos testados podem causar modulação de proteínas importantes para a fisiologia do verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Dessa forma, esse estudo é de grande relevância devido ao fato que, essas informações poderão nos auxiliar a entender melhor os mecanismos envolvidos na ação desses compostos naturais e futuramente de outros compostos a serem estudados na busca pelo melhor tratamento para o controle da esquistossomose mansônica.

## 6 – Conclusão

1 – O extrato da etanólico da *Mentha piperita* L. apresentou efeito esquistossomicida contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, sendo observadas separação e morte de todos os casais de vermes nas concentrações acima de 1000ug/mL;

2 – O extrato etanólico da *M. piperita* sobre o verme adulto de *S.mansoni* apresentou significativas reduções na viabilidade dos vermes nas concentrações de 1000 - 2500 µg/mL, sendo observado o mesmo com Praziquantel (farmaco de recomendada contra *S.mansoni*);

3- O extrato etanólico da *M. piperita* foi mais eficaz que Praziquantel, demonstrando menos quantidade de ovos de *S. mansoni* desenvolvidos;

4- Das três frações do extrato etanólico da *M.piperita* as partições FA e FH também apresentaram ótimos resultados contra o verme adulto, sendo mais eficientes em induzir morte de 50% dos vermes, a partir da concentração de 500 µg/mL, e a partição com hexano foi capaz de promover redução significativa da atividade motora dos vermes;

5- O extrato etanólico da *Harpagophytum procumbens* induziu separação de casais a partir de 500 µg/mL após 24h. E com 1000 µg/mL após 24h, morte da maioria dos casais.

6- Na eletroforese bidimensional foi possível identificar *spots* com diferenças significativas entre os géis controles e os tratamentos, após a análises com o *software Image Master Platinum 2D 7* (GE healthcare). Demonstrando assim que os extratos testados causaram efeitos na expressão de proteínas dos vermes adultos.

7-Na espectrometria de massas identificamos proteínas de importância para a sobrevivência do verme adulto de *S. mansoni*, como enzimas da via glicolítica e proteínas estruturais, além de serem diferentes das proteínas em humanos, são importantes alvos para estudos de fármaco. Comprovando assim o efeito antiparasitário.

## 7 –Bibliografia

- ABATH, F.G.C.; WERKHAUSER, R.C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: Functional and immunological features. **Parasite Immunology**, v.18, p.15-2-, 1996.
- ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SAHN, A.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for *schistosomiasis mansoni*: alternatives and challenges, **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 955-956, 2009.
- AEBERSOLD, R.; MATHIAS, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. v.422, p.198-207, 2003.
- AFOLAYAN, A.J.; ADEBOLA, P.O. *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v.3 (12), p. 683-687, 2004.
- ALBERICE, J. V. Avaliação analítica de potenciais biomarcadores para câncer de bexiga em urina. Instituto de Química de São Carlos – **Universidade de São Paulo (USP)**. São Carlos – SP, Tese (Doutorado), 2014.
- ANAUATE, M.C.C. Efeito dos extrato de *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) e suas frações na atividade da COC-1 e COX-2 e na produção de NO em sangue total. **Universidade de São Paulo** (Tese-Doutorado), São Paulo-SP, 2007.
- AREIAS, F.M.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; SEABRA, R. M. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. **Food Chem.** v.73: 307–311,2001.
- ARUMUGAM, P.; MURUGAN R.; SUBATHRA M.; RAMESH, A. Superoxide radical scavenging and antibacterial activities of different fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* (L.). **Med. Chem. Research**, v.19, p. 664-673, 2010.
- ARUMUGAM, P.; RAMAMURTHY, P.; RAMESH, A.; Antioxidant and cytotoxic activities of lipophilic and hydrophilic fractions of *Mentha Spicata* L. (Lamiaceae). **Inter. Jour. Food Procter**.v.13, p.23-31, 2013.
- BARBERATO, S. Novos derivados da oxamniquina potencialmente esquistossomicida. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 1996.
- BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Men Inst. Oswaldo Cruz**. v.90, p.221-227,1995.

- BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis vaccine development progress and prospectus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 93, n 1, p. 95-101, 1998.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; MARTINS, G. R., BARROSO, I. C.; MARINHO, R. C.; AGUIAR, T. D. F.; TEIXEIRA, M. F. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa com o ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. *Acta. Veterinária brasileira*, v.7, n. 2, p.100-112, 2013
- BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. *Travel Med Infect. Dis.* v. 2, n. 1, p. 5-11, 2004.
- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C. W.; RISTER, R. S. . The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines. **American Botanical Council**: Austin, 1998.
- BOTSARIS, A.S.; MACHADO, P.V.; Introdução a fitoterapia. **Memento Terapêutico Fitoterápicos**. 1:8-11, 1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRASCHI, S.; WILSON, R.A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell. Proteomics*. v. 5, n. 2, p. 347-356, 2006.
- BRASCHI, S.; BORGES, W.C.; WILSON, R.A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 205-212, 2006.
- BRIEN, S.; GEORGE, T.; LEWTH, M.A., MACGREGOR, G. Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for Osteoarthritis: a review of efficacy and safety. *The Journal of alternative and complementary medicine*, v.12, p. 981-93, 2006.
- BRINDLEY, P.J.; SHER A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* 139: 215 – 20, 1987.
- BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J.; The social context of schistosomiasis and its control: Na introduction and annotated bibliography. **World Health Organization (WHO)**. 2008.

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CAMPBELL W.C.; REW, R.S. Chemotherapy of parasitic diseases. Plenum Press, **Journal of Parasitology**. v. 73, n. 1, p. 250. 1986.
- CANTÚ, M.D. Análise Proteômica Aplicada para o Estudo da Morte Súbita dos Citros. Tese ( Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, **Universidade de São Paulo ( USP)**, 2007.
- CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years war on the worm. **Parasitol. Today**. v. 14 n. 10, p. 379-384, 1998.
- CARVALHO, O.S., JANNOTTI-PASSOS L.K., CALDEIRA R.L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero Biomphalaria. In: CARVALHO O.S., COELHO P.M.Z., LENZI H.L. Schistosoma mansoni & Esquistossomose uma visão multidisciplinar. 1 ed. Rio de Janeiro: **editora FIOCRUZ**; p. 311-34, 2008.
- CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L. G.; CHAVES, F. C. M.; STEPHAN, M. P.; BIZZO, H. R.; AMARANTE, A. F. T. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veter. Parasito.** v.183, p. 260-268, 2012.
- CASTRO, A.P.; MATTOS, A.C.A.; SOUZA, R.L.M.; MARQUES, M.J.; SANTOS, M.H. Medicinal plants and their bioactive constituents: A review of bioactivity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7(21), p.p. 1515-1522, 2003.
- CASTRO, D.M.; MARTINS, E.R.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas Medicinais. Viçosa, MG. **Editora UFV**, p. 220, 2000.
- CHAIT, B. T. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?. **Science**. v. 314, p. 65-66, 2006.
- CIOLI, D. Chemotherapy of Schistosomiasis: an Update. **Parasitology Today**, 14 (10): 418-422, 1998.
- CIOLI, D.; PICA-MALTOCCIA, L.; ARCHER, S. An Schistosomal drugs: past, Present and future? **Pharmac. Ther.**, v. 68, n. 1, p. 35-85, 1995.
- CLARK, R.J.; MENARY, R.C.; Variations in composition of peppermint oil in relation to production areas. **Econ Bot.** v.35: p.59-69, 1981.
- COMLEY, J.C.W., Rees, M. J., Turner, C.H , Jenkins, D.C. Calorimetric quantitation of filarial viability. **Int J Parasitol** 19:77-83, 1989.

- COMOY, E.E.; CAPRON, A. THYPHRONITIS, G. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. **Scand J. Immunol.** V.47, p. 44-452, 1998.
- COUTINHO, A.; SILVA, M.; GOLÇALVES, J.; Estudo Epidemiológico de Esquistossomose Mansônica em Áreas de Irrigação do Nordeste Brasileiro. **Cad Saude Publica.** 8:302-310, 1992.
- DAVIS, A. Antischistosomal drugs and clinical practice. In: Human Schistosomiasis (eds P Jordan, G Webbe & RF Sturrock). **CAB International**, Wallingford, UK, pp. 367-404, 1993.
- DAY, T. A.; BENNET, J. L.; PAX, R. A. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**, 8: 342-344, 1992.
- DEJANI, N.N. Efeito Biológico da *Mentha piperita* L. Durante a Esquistossomose Mansônica Experimental. Dissertação (Mestrado), Biotecnologia, **Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)**, 2011.
- DEJANI, N. N.; SOUZA, L. C.; OLIVEIRA, S.R.P.; NERIS, D. M.; RODOLPHO, J. M. A.; CORREIA, R. O.; RODRIGUES, V.; SACRAMENTO, L. V. S.; FACCIOLI, L. H.; AFONSO, A.; ANIBAL, F. F. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni* -infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x pepiri* L. **Immunobiology**, v.219, p.627-623, 2014
- DEORE, S. L.; KHADABADI, S.S.; KAMDI, K.S.; INGLE, C.P.; KAWALKAR, N.G.; SEWARKAR P.S.; PATIL, U. A.; VYAS, A. A. *In vitro* anthelmintic activity of *Cassia tora*. **Inter. Jour. Of ChemTech. Research.** v.1, n.2, p.177-179, 2009.
- DIAS, L. C. S.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M. F.; MAFRA, G. L. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. **Rev. SaúdePúb.** 12 (1): 110, 1978.
- DIMANDJA, J. M. D.; STANFILL, S.; GRAIGER, J.; PATTERSON, D. G. Jr. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) to the qualitative analysis of essential oils. **J High Resolut Chromatogr.** v.23: 208–214, 2000.
- DUBAND, F.; CARNAT, A. P.; CARNAT, A.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CLAIR, G.; LAMAISON, J. L. Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, *Mentha piperita* L. **Ann Pharm Fr.**v.50, p.146–155, 1992.
- DUNNE, D.W.; WEBSTER, M.; SMITH, P.; *et al.* The isolation of a 22 kDa band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to

- demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it contains are associated with human resistance to refection. **Parasite Immunology**,V.19, 79-89,1997.
- FALLON, P.G.; DOENHOFF, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 51, n. 1, p. 83- 88, 1994.
- FARIAS, L.P.; CARDOSO F.C.; MIYASATO, P.A.; MONTOYA, B.O.; TARARAM, C.A.; ROFFATO, H.K.; KAWANO, T.; GAZZINELLI, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COULSON, P.S.; WILSON, R.A.; OLIVEIRA, S.C.; LEITE, L.C.C. *Schistosoma mansoni* stomatin like protein-2 is located in the tegument and infuces partial protection against challenge infection. **Neg. trop. Dise.** v.4, p.e-597, 2010.
- FECKA, I.; KOWALCZYK, A.; CISSOWAKI W. Optimization of the separation of flavonoid glycosides and rosmarinic acid from *Mentha piperita* on HPTLC Plates. **J. Plan. Chrom.** v.17, p. 22-25, 2004.
- FRANCIS, P.;BICKLE, Q. Cloning of a 21.7-KDa vaccine-dominant antigen gene of *Schistosoma mansoni* reveals an EF hand-like motif.**Mol. Biochem. Parasitol.**v.50, n.2, p.215-24, 1992.
- FURLAN, M.R. Cultivo de plantas medicinais. Cuiabá: Sebrae.**Coleção Agroindústria.** v.13, p.137, 1998.
- GIRME, A. S.; BHALKE, R. D.; GHOGARE, P. B.; TAMBE, V. D.; JADHAV, R. S.; NIRMAL, S. A. Comparative *in vitro* anthelmintic activity of *Mentha piperita* and *Lantana câmara* from estern India. **Dhaka Uni. Jour. Of Pharm. Scien.** v.5, n.1, p.5-7, 2006.
- GOBERT, G.N.; STENZEL, D.J.; McMANUS, D.P. Immunolocalisation of the glutathione S-transferases, GST-26 and GST-28, wthin adult *Schistosoma japonicum*. **Int. Jor. for Parasitology**, v.28, n.9, p. 1437-1443, 1998.
- GHERMAN, C.; CULEA, M.; COZAR, O. Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. **Talanta.** v.53, p. 253–262, 2000.
- GRANT, L.; McBEAN, D.E., FYFE, L. WARNOCK, A.M. A Review of the Biological and potential Therapeutic Actinos of *Harpagophytum procumbens*. **Phytotherapy Research**, v.21, p.199-2009, 2007.
- GRYSEELS, B.; NKULIKYINKA, L.; COOSEMANS, M.H. Field trials of praziquantel and oxamniquine for the treatment of *schistosomiasis mansoni* in Burundi. **Trans. Soc. of Trop. Med. and Hyg.** v. 81, p. 641-644, 1987.
- GRYSEELS, B.; MBAYE, A.; DE VLAS, S.J.; STELMA, F.F.; GUISSA, F.; VANLIESHOUT, L.; FAYE,D.; DIOP, M.; LY,A.; TCHUEM-TCHUENTE, L.A.;



- ENGELS, D.; POLMAN, K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance?. **Trop. Med. and Inter. Health**. v.6, 864-873, 2001.
- GUIMARÃES, I.; TAVARES-NETO, J.; Transmissão urbana de esquistossomose em crianças de um bairro de Salvador, Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.39, p.451-455, 2006.
- HAGAN, P.; APPLETON, C.C.; COLES, G.C.; KUSEL, J.R.; TCHUEM-TCHUENT, L.-A; Schistosomiasis control keep taking the tablets trends. **Parasitol**. v. 20, n. 2, p. 92-97, 2004.
- HARROP, R.; COULSON, P.S.; WILSON, R. A. Characterization, cloning and immunogenicity of antigens released by lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. v.118, p.583-594, 1999.
- HERRMANN, E.C.; Jr. KUCERA, L.S. Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae). 3. Peppermint (*Mentha piperita*) and other mint plants. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.124, p. 874– 878, 1967.
- HO, Y.; GRUHLER, A.; HEILBUT, A.; BADER, G.D.; MOORE, L.; *et al*. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**. v.415, p.180-183, 2002.
- HONG, Z.; KOSMAN, D.J.; THAKUR, A.; REKSH, D.; LOVERDE, P. T. Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. **Infect. Immun**. v.60, n.9, p.3641-3651, 1992.
- HOFFMANN, B.G.; LUNDER, L. T. Flavonoids from *Mentha piperita* leaves. **Planta Med**.v.50, p. 361, 1984.
- INOUE, T.; SUGIMOTO, Y.; MASUDA, H.; KAMEI, C.;. Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. **Biol Pharm Bull**.v.25, p. 256–259, 2002.
- ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, N.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **J. Agric. Food Chem**. v.50, p.3943-3946, 2002.
- JORGE, I.; NAVARRO, R. M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C.; JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression. Level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, v.5, p.22-234, 2005.

- JOHN, J.; MEHTA, A.; SHUKLA, S.; MEHTA, P. A report on anthelmintic activity of *Cassia tora* leaves. **Songklanakarín J Sci Technol.** v.31, n.3, p.269-271, 2009.
- KANAMURA, H.; HANCOCK, K.; RODRIGUES, V.; DAMIAN, R.T. *Schistosoma mansoni* Heat Shock Proteins 70 elicits na early humoral imune response in *S. mansoni* infected babbonns. Mem . **Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, p. 711-716, 2002.
- KATIK, L.M.; CHAGAS, A.C.S.; BIZZO, H.R.; FERREIRA, J.F.S.; AMARANTE, A.F.T. Anthelmintic activity of *Cymbopogn martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Menhta piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* test. **Vet. Paras.** v.183, p.103-108, 2011.
- KATZ, N. Experiência com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 22: 40 – 51, 1980.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistose, barriga d'água. **Cien. Cult.** v.55, n.1, p.38-43, 2003.
- KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol Today.** v.11, p.129-136, 1990.
- KHALIFE, J.; LIU, J. L.; PIERCE, R.; PORCHET, E.; GODIN, C.; CAPRON, A. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. **Parasitology.** v.108, p. 527-532, 1994.
- KLITZKE, C.F. <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=19&numero=2>. Soc.**Bras. de Espectro. de mass.**Acesso em 16/01/2012.
- KLOOS, H.; PASSOS, L. K. J.; LOVERDE, P.; OLIVEIRA, R. C.; GAZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in diferente habitats in a rural área in the Jequitinhaha Vally, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.99, n.7, p. 673-681, 2004.
- KNOBLOCH, J.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. Herrrbimycin A suppresses mitotic Activity and eggsproduction os female *Schistosoma mansoni*. **Jour. Parasit.**, v.36, n.12, p. 1261-1272,2006.
- KUMAR, V.; GRYSEELS, B. Use of praziquantel against schistosomiasis: a review of the current status. International Journal of Antimicrobial Agents 4, 313±320, 1994. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 4a. Ed, **Editora Sarvier**, 2007.
- LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-695, 1970.

- LAMMIE, P. J.; FENWICK, A.; UTZINGER, J.. A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. **Trends Parasitol.** V.22, p.313–321, 2006.
- LANHERS, M.C., FLEURENTIN, J., MORTIER F., VINCHE A., YOUNOS C. Anti-inflammatory and analgesics effects of na áqueos extract of *Harpagophytum procumbens*. **Planta Medica.** v.58, p.117-22, 1992.
- LORENZI, H.; MATOS, J.F.A. Plantas Mediciniais do Brasil: Nativas e exóticas. 2 ED. Nova Odessa. **Editora Plantarum**, 2002.
- LOZAK, A.; SOLTYK, K.; OSTAPCZUK, P.; FIJIJALEK, Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. **Sci Total Environ**, v. 289, p.33–40, 2002.
- MACHADO, P.A. The brazilian program for schistosomiasis control, 1975-1979. **Am. J.Trop. Med. Hyg.**, 31: 76-86, 1982.
- MAGALHÃES, L.G.; MACHADO, C.B.; MORAIS, E.R.; MOREIRA, E.B.; SOARES, C.S.; DA SILVA, S.H.; DA SILVA FILHO, A.A.; Rodrigues, V. *In vitro* schistosomicidal activity os curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Paras. Res.**, v.104, n.5, p. 1197-1201, 2008.
- MATSUMOTO, Y.; PERRY, G.; LEVINE, R.J.C.; BLANTON, R.; MAHMOUD, A.A.F.; AIKAWA, M. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. **Nature**, v.333, p.76-78, 1988.
- McGONIGLE, S.; LOSCHIAVO, M.; PEARCE, E.J. 14-3-3 Proteins in *Schistosoma mansoni*; Identification of a second epsilon isoform. **Int. J. Parasit.**, v. 32, p. 685-693, 2002.
- MCKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B.; A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Menthapiperita* L.). **Phyt. Res.** v.20, p. 619-633, 2006.
- MELHORN, H., BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; FRENKEL, J. K. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Arzneim.** v.31, p.544-554, 1981.
- MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Assoc. Med. Brasil.** v.45, n.2, p. 181-189, 1999.

- MICHAELS, R.M.; PRATA, A. Evolution and characteristics of *Schistosoma mansoni* eggs laid *in vitro*. **J Parasitol**, v.54, n.5, p.921– 930, 1968.
- MNCWANGI, N.; CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.; GERICKE, N. Devil's claw- A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. **J. Ethnopl.** v. 143, p.755-771, 2012.
- MORAES, M.C. Espectrometria de Massas com Ionização por “ Electrospray” Aplicada ao Estudo de Espécies Inorgânicas e Organometálicas. **Quim. Nova**, V.26, N°4, 556-563, 2003.
- MORENO, A.I.; VALARDE, F.I.; ACEVEDO, J.G.A. In vitro evaluation of fescicolide activity with hexane, metanol na ethyl acetate with extracts processed and obtained from some mexican plants used in traditional medicine based on ethno botanical studies. **American Journal of Plant Sciences**. v.3, p.506-511, 2012.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **An. Bioch.** v. 117. N.2. p.307-310, 1981.
- MOURÃO, M. M. Silenciamento gênico por interferência de RNA (RANI) de transcritos de *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado), **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte- MG, 2009.
- NASCIMENTO, G.G.F, LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian J. Microbio.** v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- NELSON, L. N.; COX, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. ed.4, **SARVIER**, São Paulo – SP, 2006.
- NEVES, D.P. Parasitologia Humana, 11<sup>a</sup> edição, São Paulo, **Editores Atheneu**, 2005.
- NING, Z.; ZHOU, H.; WANG, F.; ABU-FARHA, M.; FIGEYS, D. Analytical aspects of proteomics: 2009\_2010. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4407–4426, 2011.

- NOGUEIRA, D. B. Análise diferencial do proteoma da polpa do mamão durante o amadurecimento utilizando eletroforese bidimensional. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP)**. São Paulo –SP, 2010.
- OLIVEIRA, S. R. P. Avaliação do efeito do extrato etanólico bruto de *Harpagophytum procumbens* em camundongos infectados com *Toxocara canis*. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos –SP, 2012.
- PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; KOLE, C.; Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. **Microbios**, v.86, p. 237–246, 1996.
- PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Ver. Bras. Malar.**, v.8, p.589-597, 1956.
- PEREIRA, A.S.A. Análise ultraestrutural da interação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana com o tegumento do *Schistosoma mansoni* e identificação da proteína ligante de LDL. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas – **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife-PE, 2008.
- PEREIRA. C.; FALLON, P.G.; CORNETTE. J.C. Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. v. 117, n. 1, p. 63-73, 1998.
- PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. Parasitologia médica, 11 ed, **Editora Guanabara Koogan**, São Paulo – SP, 1988.
- PITTLE, M. H.; ERNST, E. Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. **Am J Gastroenterol**.v.93, p. 1131–1135, 1998.
- POSTIGO, M.P. Planejamento racional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2008.

- REY, L. Parasitologia. 4ªed. Rio de Janeiro, **Editora Guanabara Koogan**, 2008.
- RIBEIRO, F.; MELLO, R.T.; TAVARES, C.A.P.; KUSEL, J.R.; COELHO, P.M.Z. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 46 (4): 231 – 233, 2004.
- ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. **Com. Embr.**, 2005.
- ROSA, C.; MACHADO, C.A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. **Rec. Bras. Farm.** v.88, n.1, p. 26-32, 2007.
- SABAH, A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M.J.; *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. **Exp. Parasitol.** v.60, p.348 – 354, 1985.
- SAMEJIMA, K.; KANAZAWA, K.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Luteolin: a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. **J Agric Food Chem.** v.43, p.410– 414, 1995.
- SANTOS, R. S.; PAULA, N. M.; BARBOSA, M. S.; SOARES, C. M. A. Caracterização imunológica da proteína recombinante gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase do patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. **SaBios. Ver. e Biol.** v.7, n.2, p.35-45, 2012.
- SILVA, J.R.M.; NEVES, R.H.; GOMES, D.C. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar/ Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. **Rio de Janeiro: Fiocruz**, p.45-73, 2008.
- SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J.; Infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni*, and the recovery of adult worms. **Parasitology**. v. 55, p.695-700, 1965.

- STAVITSKY, A.B. Regulation of Granulomatous Inflammation in Experimental Models of Schistosomiasis. **Infection and Immunity**. v. 72, n.1, p. 1-12, 2004.
- STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, metaanalysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**. v.6, p.411-425, 2006.
- STELMA, F.F.; TALLA, I.; SOW, S.; *et al.* Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. and Hyg.**v.53, p. 167-170, 1995.
- STRANGE, R.; SPITERI, M.A.; RAMACHANDRAN, S.; FRYER, A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **M.Res./Fund.I and Mol. Mechanisms of Muta** v.482, p. 21-26, 2001.
- TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Praziquantel kills *Schistosoma mansoni* adult worm action. **Inter. Jour. Antimicrobial Agents**, 29 (5): 570-575, 2007.
- TAVARES, J. P.; MARTINS, I. L.; VIEIRA, A. S.; LIMA, F. A. V.; BEZERRA, A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associação de plantas, mel, própolis. **VER. BRAS. FARMACOGNOSIA**. v.16, n.3, p.350-356, 2006.
- TCHWNTÉ, L.A.T.; BARRAL, B.;IMBERT-ESTABLET, D.; MORAND, S.; MOHOMÉ, N. JOURDANE, J.; *Schistosoma mansoni*: Lack of Prezygotic Reproductive Isolation between African and South American Strains. **Exp. Paras.**, v80, p.323-327 (1995).
- VAN DER WERF, M.J; SAKE, J.V; SIMON, B; CASPAR, L.W.N; NICO, J.D.N; DIK, J.D.H; DIRK, E. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection sub-Saharan. **Africa. Acta Trop**. v. 86, n. 2-3, p. 125-139. 2003.
- VAN HELLEMOND, J.J.; RETRA, K.; BROUWERS, J.F.H.M. VAN BALKOM, B.W.M.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C.B.; TIELENS, A.G.M.

- Functions of the tegumento of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **Int.J. for Parasitol.**, v.36,p.1-9,2006.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E.A. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.** v. 35, n. 2, p. 148–157. 2003.
- VIDAL, F; VIDAL, J.C.; GADELHA, A.P.R.; LOPES, C.S.; COELHO, M.G.P.; MONTEIRO-LEAL, L.H.. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *M. piperita* L ontrophozoites. **Experimental Parasitology**, v.11, n.1, p. 25-31, 2007.
- VITZTHUM, F.; BEHRENS, F.; ANDERSON, N.L.; SHAW, J.H. Proteomics: From basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. **J. Prote. Res.** v.4, p. 1086-1097, 2005.
- XIAO,S.H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.;UTIZINGER, J.;DONG,Y.; ENDRISS,Y.;VENNERSTROM,J.L.; TANNER, M. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Ant. Ag. Chem.**, v.51, n.4, p.1440-1445,2007.
- WEBSTER,M.; FULFORD, A.J.C.; BRAUN, G. *et al.* Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6-kilodalton antigen from schistosomiasis mansoni adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. **Inf. and Im.** v.64, 4042-4046, 1996.
- WECKESSE, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPPE, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v.14, p. 508-516, 2007.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Electrophoresis in Practice: a laboratory manual of proteome analysis: Freiburg, Wiley-Blackwell, 2005, p. 27-32.
- WHO (World Health Organization). Parasitic disease Schistosomiasis. 2014.
- WHEATER, P.R.; WILSON, R.A. *Schistosoma mansoni*: a histological study of migration in the laboratory mouse. **Parasitology**. v. 79, p. 49-62, 1979.
- WILLIAMS, S; BOTROS, M; ISMAIL, A; FARGHALLY, T.A; DAY; BENNETT, J. Praziquantel- induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitology**. v. 122, p. 63-66, 2001.



- WILSON, R.A.; CURWEN, R.S.; BRASCHI, S.; HALL, S.L.; COULSON, P.S.; ASHTON, P.D. From genomes to vaccines via the proteome. **M. Inst.. Oswaldo Cruz.** v.99, n1, p. 45-50, 2004.
- YANG, W.; ZHENG, Y.Z.; JONES, M.K.; McMANUS, D.P. Molecular characterization of a calponin-like proteins from *Schistosoma japonicum*. **Mol. and Bioch. Parasit.** v.98, p. 225-237, 1999.
- ZHANG, X. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002.
- ZHANG, Y. *et al.* Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against *Schistosoma japonicum* infection. **Vaccine**, v.20, 724-730, 2001.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J Agric Food Chem.** v. 49, p. 5165– 5170, 2001.
- ZIMNA, D.; PIEKOS, R. Extraction of eight essential elements from the leaves of peppermint, *Mentha piperita* (L.). **Huds. Herba Hungar.** V.27, p.65–75, 1988.

## 8 –Anexos

Anexo 1: Aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propg@power.ufscar.br](mailto:propg@power.ufscar.br) - [www.propg.ufscar.br](http://www.propg.ufscar.br)

Protocolo CEEA nº 050/2008

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto pesquisa **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E IMUNOMODULATÓRIOS DOS EXTRATOS DE MENTHA SP NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**, elaborado por Fernanda de Freitas Aníbal, Izaltina Silva Jardim, Adriana Malheiro, Naiara Dejadi, Laís Cristina de Souza, Vinicius Baraglia Amorim e Bruno José conti.

São Carlos, 17 de fevereiro de 2009.

  
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal