A RBF é uma publicação da ABF

REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA (RBF)
BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACY (BJP)
www.rbfarma.org.br

PESQUISA/RESEARCH

Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel

Evaluation of antioxidant potential, antimicrobial and schistosomicidal activities of ethanolic extract standardized leaves from *Mikania glomerata* Sprengel

Recebido em 30/07/2012

Aceito em 16/04/2013

Lorena Citó Lopes Resende Santana,[1] Oskar Almeida Silva,[2] Maria dos Remédios Mendes de Brito,[2] Juceni Pereira Lima David,[3] Jorge Maurício David,[4] Karen Cristine Santos Galvão,[5] Josué de Moraes,[6] & Rivelilson Mendes de Freitas [1,2] *

[1] Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Piauí, PI, Brasil

[2] Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, PI, Brasil

[3] Departamento do Medicamento da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, BA, Brasil

[4] Instituto de Química da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, BA, Brasil

[5] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos do programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, SP, Brasil

[6] Supervisão de Vigilância em Saúde, SUVIS Casa Verde, Secretaria de Saúde da Cidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

A utilização de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos é muito comum. A *Mikania glomerata* Sprengel é uma planta medicinal, popularmente utilizada para o tratamento da tosse. Na tentativa de ampliar e comprovar atividades biológicas e farmacológicas desta espécie, esse estudo experimental teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante e as atividades farmacológicas (antimicrobiana e antiesquistossomose) do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata*. Para tanto, foram utilizados três ensaios antioxidantes *in vitro* [inibição da produção do íon nitrito, do radical hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)]. Os resultados revelaram valores de CE_{50} de 0,106, 1,102 e 1,872 µg/mL para a produção de nitrito, do radical hidroxila e de TBARS, respectivamente. Para determinar a ação antimicrobiana do extrato foram utilizadas cepas de bactérias padrões e clínicas de *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.* Verificou-se que a concentração de 20 mg/mL do extrato apresentou efeito bactericida em *S. aureus* e *E. coli.* Por sua vez, a avaliação esquistossomicida do extrato causou alterações morfológicas no tegumento e mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (300 µg/mL). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a *M. glomerata* apresenta potencial antioxidante que pode ser correlacionado com seus efeitos antimicrobiano e esquistossomicida.

Palavras-chave: Antimicrobiana, Antioxidante, Guaco, *Schistosoma mansoni*

ABSTRACT

Medicinal plants' usages by population with therapeutic purposes are very common. *Mikania glomerata* Sprengel is a medicinal plant commonly used to treat cough. In an attempt to expand and establish biological and pharmacological activities of this species, this experimental study aimed to evaluate the antioxidant, pharmacological activities (antimicrobial and antischistosomal) of ethanol extract from *M. glomerata* leaves. Thus, three *in vitro* antioxidant assays were performed [inhibition of nitrite ion production, hydroxyl radical and the reactive substances with thiobarbituric acid (TBARS)]. The outcomes revealed EC_{50} values of 0.106, 1.102 and 1.872 µg/ml for nitrite, hydroxyl radical and TBARS production, respectively. To determine the antimicrobial action, they were used pattern and clinical bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. It was noted that the concentration of 20 mg/ml of the extract showed bactericidal effect on *S. aureus* and *E. coli*. In turn, schistosomicidal assessment of the extract caused morphological changes in the tegument and mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms (300 µg/ml). Thus, the results suggest that *M. glomerata* has antioxidant potential probably correlated with its antimicrobial and schistosomicidal effects.

Keywords: Antimicrobial, Antioxidant, Guaco, *Schistosoma mansoni*

* Contato: Rivelilson Mendes de Freitas, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Cep: 64.049-550. Fone: +55-86-3215-5870. E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento as doenças podem estar relacionadas com a ausência de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso ao tratamento (Kumate1997). Neste contexto o uso de plantas medicinais pela população é bastante praticado, porém nem sempre com ação comprovada para inúmeras patologias.

Dentre estas doenças podem ser destacadas as causadas por bactéria, fungos, vírus e parasitas. Nestes processos patológicos muitas vezes os tratamentos atuais são refratários ou não há tolerância, uma vez que podem apresentar uma série de efeitos adversos (Allegretti et al., 2012).

Pode ser observado um número cada vez maior de pesquisas envolvendo a obtenção e aproveitamento de recursos naturais, impulsionadas pela sua crescente demanda, remetendo à necessidade de estudos para sua produção de forma sustentada. As propriedades antimicrobianas, antiesquistossomose e antioxidantes de extratos vegetais e/ou produtos isolados de plantas medicinais tem despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em diferentes produtos (Marques et al., 2011; Moraes et al., 2013).

Em geral, as bactérias têm habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos microrganismos resistentes está crescendo de forma significativa, e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Por esse motivo, medidas devem ser tomadas para resolver esse problema. Por exemplo, controlar o uso de antibióticos, ampliar pesquisas para melhor entender o mecanismo genético de resistência e desenvolver estudos para a descoberta de novas drogas antimicrobianas sintéticas ou naturais (Cansian et al., 2010).

Em células de hospedeiros infectados com diferentes espécies de parasitas as quantidades de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) que causam peroxidação lipídica são elevadas, provocando danos em teciduais e/ou sistêmicos. O desequilíbrio entre a produção de EROs e a remoção dos mesmos pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica com elevada concentração de EROs que causam danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (Camargo 2009). Já é sabido que em infecções causadas por *Schistosoma mansoni*, bactérias e fungos ocorrem um aumento na produção de EROs. Em particular na esquistossomose próximo aos ovos depositados no fígado também pode ser verificado um aumento na produção de EROs que permite a destruição desses ovos. No homem a infecção por *S. mansoni* pode estar associada aos níveis aumentados de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e EROs que podem facilitar a progressão da doença que podem ser prevenidos ou reduzidos com o uso de produtos de origem natural (Cunha 2008).

Diante dessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes *in vitro* do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel, bem como investigar os seus efeitos farmacológicos (antimicrobiano e antiesquistossomose).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As partes aéreas de *M. glomerata* Sprengel foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Núcleo de Fitoterapia (NUFITO), que faz parte do Núcleo de Assistência Farmacêutica (NUASF) da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA). E a exsicata (número 27.041) foi depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí (UFPI). A retirada foi feita manualmente, sendo, então, lavada em água corrente, seguida de água destilada. Após a pesquisa de materiais estranhos, a matéria-prima vegetal foi seca à sombra.

Preparação do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata* Sprengel

O extrato foi preparado nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI em Março de 2011, por percolação com maceração prévia por 24 h utilizando solução hidro-alcoólica a 70%, utilizando-se a proporção de 15 mL de solvente para cada 1 g de droga vegetal. A solução extrativa foi então concentrada em estufa com circulação forçada de ar para eliminar o teor alcoólico e aumentar o teor de sólidos, o que correspondeu a uma redução de 75% do volume inicial. Após filtração a vácuo, o filtrado foi concentrado em rota evaporador e liofilizado.

Determinação da granulometria do pó obtido das folhas secas de *M. glomerata* Sprengel

A determinação da granulometria (tamanho das partículas do pó e distribuição de tamanho) das folhas secas de *M. glomerata* Sprengel foi realizada nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI em março de 2011 seguindo a metodologia prevista na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988). O procedimento foi desenvolvido mecanicamente, usando um agitador que possui movimentos horizontais e verticais e empregando tamises padronizados superpostos, partindo de maior diâmetro ao menor. Uma porção de 30 g foi colocada no tamis de maior malha e submetida à tamisação durante 30 minutos.

Quantificação das substâncias marcadora/princípios ativos do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata* Sprengel

A amostra foi filtrada em unidade filtrante 0,45 µm (Millipore, EUA). Para o doseamento, foi empregado um sistema cromatográfico Ultimate 300 (Dionex) acoplado a um detector de arranjo de diodos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE- DAD), sob as seguintes condições: coluna C18 (3 µm, 7.5 x 3 mm), volume de injeção 10 µL, fase móvel (metanol/acetonitrila/água acidificada (ácido acético 0,01%), (15:5:80), eluição gradiente, fluxo 1 mL/min e λ=254 nm.

A quantificação da cumarina e do ácido *o*-hidróxicinâmico princípios ativos do extrato etanólico padronizado foi realizada utilizando como padrões externos a cumarina (1,2-benzopirona) e o ácido *o*-hidróxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas) obtidos diretamente da Sigma Chemical Co. St. Louis, M., (USA). Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução estoque a 0,2 mg/mL em metanol/acetonitrila/água acidificada (ácido acético 0,01%) nas seguintes proporções 15:5:80. Em seguida, as alíquotas foram diluídas na mesma solução estoque em estudo. As soluções obtidas nas concentrações de 0,06 a 2,0 mg/mL foram injetadas em triplicata no sistema cromatográfico. O teor da cumarina e ácido *o*-hidróxicinâmico foi calculado a partir da equação da reta obtida com a curva de calibração para ambos os padrões. A análise cromatográfica por CLAE do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel foi validada e indicou a presença de uma mistura de ácido *o*-hidróxicinâmico (13,4 ± 0,14 mg) e cumarina (1,5 ± 0,01 mg) por grama de extrato, respectivamente. Esses experimentos foram realizados no Instituto de Químcia e Departamento do Medicamento da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia em julho de 2011.

Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata* Sprengel *in vitro* contra a produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação do conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica (Esterbauer & Cheeseman 1990) nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI em agosto de 2011. Este método foi usado para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de *M. glomerata* Sprengel usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídio (Guimarães et al. 2010). Inicialmente, a gema de ovo foi homogeneizada (1%, w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Deste homogenato 1 mL foi sonicado e homogeneizado com 0,1 mL do extrato de *M. glomerata* Sprengel em diferentes concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropano 0,12 M). O controle foi realizado apenas com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em soulção salina 0,9%) usado para dissolver a susbtância avaliada.

As reações foram realizadas durante 30 min a 37 ºC. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 ml de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, foram medidas as absorbâncias a 532 nm dos tubos contendo diferentes concentrações da amostra utilizando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas por AAPH (controle induzido).

Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata* Sprengel *in vitro* contra a produção do radical nitrito (NO_2^-)

O óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito ($2NO + O_2 \rightarrow NO_2^-$), que foram medidos pela reação de Griess (Ferreira et al. 2008). A mistura reacional (1 mL) contendo nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 10 mM e o extrato avaliado em diferentes concentrações foram incubados a 37 °C durante 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância dos controles negativos (apenas 10 mM de nitroprussiato de sódio e veículo) e das preparações para ensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS. Esse procedimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI em agosto de 2011.

Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico padronizado das folhas de *M. glomerata* Sprengel *in vitro* contra a produção do radical hidroxila ($OH^{\cdot}$)

A produção do radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) foi quantificada nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI em agosto de 2011, por meio da reação de Fenton. Durante esta reação foi determinado o efeito *in vitro* do extrato de *M. glomerata* Sprengel contra a produção $OH^{\cdot}$ produzido pela degradação oxidativa da 2-desoxirribose (Lopes et al. 1999). O princípio do ensaio é a quantificação do produto de degradação da 2-desoxirribose, o malonaldeído, por meio da sua condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações foram iniciados pela adição de Fe^{2+} ($FeSO_4$) com concentração final 6 mM para soluções contendo 2-desoxirribose 5 mM, H_2O_2 100 mM e tampão fosfato 20 mM (pH 7,2).

Para determinar o potencial antioxidante *in vitro* da *M. glomerata* Sprengel contra a formação do radical hidroxila, diferentes concentrações da *M. glomerata* Sprengel foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe^{2+}. As reações foram realizadas durante 15 min em temperatura ambiente e foram cessadas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v), seguido da adição de TBA 1% (v/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas em banho maria durante 15 min a 95°C, e depois resfriado à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formada por Fe^{2+}e H_2O_2.

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico padronizado das folhas *M. glomerata* Sprengel

Diluição dos fármacos e obtenção das suspensões bacterianas

O procedimento foi realizado nas dependências Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos do Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em julho de 2011 segundo as normas do NCCLS (*National Comitee for Clinical Laboratory Standards*). Para tanto, 50 mg do extrato etanólico padronizado foi diluído em 2,5 mL de DMSO em tubos de ensaio esterilizados, sob agitação por Vortex e armazenados em fluxo laminar. Os tubos foram retirados conforme necessário e usados no mesmo dia. A concentração do extrato etanólico não usada foi descartada após o experimento.

Com 24 h de antecedência, 1 cepa padrão e 1 cepa clínica de cada bactéria (*Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), oriundas da coleção de culturas da Universidade de Taubaté (CCUT) e American Type Culture Collection (ATCC), foram reativadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco).

Após incubação por 24 h a 37 ºC, para cada cepa foi preparada uma suspensão em 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) esterilizada, compatível ao padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,5 x 10^8 cels/mL) (NCCLS 2003).

Método de Microdiluição em Caldo

Foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços previamente esterilizadas por radiação. Com auxilio de uma pipeta multicanal foi colocado 200 µL de caldo Muller-Hinton nas colunas 1 e 12, e 100 µL de caldo Muller-Hinton duplamente concentrado nas colunas 2 a 11. Em seguida, com auxílio de pipeta automática foram acrescentadas na coluna dois, 100 µL do extrato etanólico padronizado previamente diluído. Novamente com a pipeta multicanal foi homogeneizada a mistura na coluna 2, e transferida uma alíquota de 100 µL da mistura para a coluna seguinte, de forma a se obter as diluições do extrato etanólico padronizado. O processo foi repetido até a coluna 11, no qual ao final, 100 µL foram desprezados para se manter o volume fixo nos poços.

A coluna 1 foi o controle positivo, contendo apenas o caldo e 100 µL da suspensão microbiana. E a coluna 12 foi o controle negativo, tendo apenas o caldo adicionado de 100 µL de salina esterilizada.

Para cada concentração do extrato etanólico padronizado utilizou-se uma única placa para todas as cepas, conforme demonstrado na Tabela 1. Os testes foram realizados em triplicata. Logo depois de completadas as placas, estas foram incubadas em estufa a 37 ºC por 24 h, e após esse período, realizou-se a leitura visual, considerando como referências de crescimento e inibição nas colunas 1 e 12, respectivamente, e complementada em leitor de Elisa (NCCLS 2003).

***Atividade bactericida do extrato etanólico padronizado de M. glomerata* Sprengel**

Após 24 h de incubação das placas, foi verificado o crescimento visualmente. Nos poços onde a densidade foi semelhante ao controle negativo, foi retirada uma alíquota de 100 µL e semeada, com auxílio de alça Drigalski, em placas de Ágar Muller-Hinton, previamente preparadas. Em seguida, foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h e observadas na presença ou não de crescimento nas placas com auxílio de lente de aumento (NCCLS 2003).

Tabela 1. Placas de diluições, com as respectivas cepas e suas origens.

Ordem na placa de Microdiluição	Cepas	Origens
A	*Staphylococcus aureus*	ATCC
B	*Staphylococcus aureus*	Enxágue bucal de pacientes com neoplasia
C	*Klebsiella pneumoniae*	ATCC
D	*Klebsiella pneumoniae*	Enxágue bucal de paciente com periodontite crônica
E	*Escherichia coli*	ATCC
F	*Escherichia coli*	Bolsa periodontal de paciente com periodontite crônica
G	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC
H	*Pseudomonas aeruginosa*	Exsudado de ferida – tíbia direita (paciente hospitalizado)

Estudos dos efeitos do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel contra *S. mansoni*

Os helmintos *S. mansoni*, linhagem BH, foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* (hospedeiro definitivo), como descrito por Moraes (2012) na Supervisão de Vigilância em Saúde, SUVIS Casa Verde, Secretaria de Saúde da Cidade de São Paulo em julho de 2011. Os hamsters foram infectados subcutaneamente com cerca de 150 cercárias e os parasitas adultos, com 49 dias de idade, foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático com o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Invitrogen, São Paulo, Brazil) e heparina sódica (Roche, São Paulo, Brazil) (Smithers & Terry 1965).

Os ensaios *in vitro* com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados como previamente descrito (de Moraes et al. 2011; Moraes et al. 2011; Veras et al. 2012). Os pares de vermes foram lavados em meio RPMI 1640 contendo estreptomicina 200 µg/ mL, penicilina 200 UI/mL e anfotericina B 2 µg/ mL (Invitrogen) e transferidos em placas para cultura de células com 24 poços (Techno Plastic Products, TPP, St. Louis, MO, USA) contendo 2 mL do mesmo meio, porém suplementado com 10% de soro de fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel foi adicionado às culturas, obtendo-se uma concentração final de 300 a 1000 µg/mL. O extrato foi dispensado a partir de uma solução estoque de 3000 µg/mL em meio RPMI 1640 contendo dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Praziquantel 5 µg/mL foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 1% foram usados como controle negativo.

As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO_2 a 5% e foram monitoradas diariamente por 5 dias, utilizando um microscópio invertido e um estereomicroscópio (Nikon, Melville, NY, USA) (de Moraes et al. 2011; Moraes et al. 2011; Moraes 2012). Para avaliar o efeito do extrato vegetal sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), capacidade reprodutiva (oviposição) e a sobrevivência dos parasitas, sendo esta

última julgada pela ausência de movimentos (Moraes 2012). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

O efeito do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel também foi avaliado no tegumento dos adultos de *S. mansoni* por microscopia confocal de varredura a laser como previamente descrito (de Moraes et al. 2011; Moraes et al. 2011; Moraes 2012). Resumidamente, no término do período de incubação (5 dias) ou ocorrência de morte, os helmintos foram fixados em solução de ácido acético, formaldeído, etanol e água destilada (AFA, 2:9:30:59, respectivamente) e analisados no microscópio confocal (Laser Scanning Microscope, LSM 510 META, Carl Zeiss, Standorf Göttingen, Vertrieb, Germany) usando filtros de 488 nm (excitação) e 505 nm (emissão) (Moraes et al. 2009). Pelo menos três áreas distintas da superfície dorsal dos helmintos foram analisadas (Moraes 2012).

Análise estatística

Os resultados que forneceram distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste *t-Student Newman Keuls* como *post hoc* teste por meio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Os dados não paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste do qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p<0,05$. Os valores da concentração capaz de inibir 50% (CI_{50}) e os seus intervalos de confiança de 95%, foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad 5.01 (San Diego, CA).

RESULTADOS

Avaliação da granulometria do pó obtido a partir das folhas secas de *M. glomerata* Sprengel

Baseado nos valores descritos na Tabela 2 e aplicando a fórmula descrita abaixo foi determinado um valor 476,19 µm para o tamanho médio do grânulo.

Tabela 2. Avaliação da granulometria do pó obtido a partir das folhas secas de *M. glomerata* Sprengel

CG (µm)	*Δm (µm)*	*m (µm)*	*F%*	*F x m*
Acima de 1200	-	-	0,12%	0,12
1200 – 850	350	1025	0,26%	266,5
850 – 420	430	635	60,24%	38252,4
420 – 250	170	335	21,38%	7162,3
250 – 180	70	215	6,45%	1386,75
180 – 125	55	152,5	3,57%	544,43
Menores que 125	-	-	6,41%	6,41
Total				47618,91

CG (µm): Classe granulométrica; Δm (µm): intervalo de abertura de malha; m (µm): abertura média da malha; F%: fração retida; *F x m:* fração retida x abertura média.

$$d = \frac{\sum(\%F)\times(m)}{100}$$

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel

O estresse oxidativo é um processo complexo envolvendo diferentes espécies reativas, vários mecanismos, nos quais muitas etapas estão envolvidas, por isso, para a avaliação de substâncias antioxidantes que inibem esse processo deve proceder por meio de diferentes métodos. Neste sentido foram realizados: a) avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a formação de nitrito; b) avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a formação do radical hidroxila, e c) avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico.

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a formação de nitrito

O radical nitrito em excesso, pode está envolvido no desenvolvimento de inúmeras patologias, sendo importante na investigação de substâncias capazes de sequestrar, ou seja, reduzir esse radical.

Os resultados obtidos, apresentados na **figura 1** demonstram que na composição do extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel, pode haver a presença substâncias antioxidantes com capacidade de reduzir o nitrito, produzido a partir do nitroprussiato de sódio em todas as concentrações testadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL), sendo dependente da concentração reduzindo de forma crescente em 12,04; 13,60; 23,87; 30,34 e 38,56% a produção do radical nitrito, respectivamente, quando comparado com o meio reacional e Trolox (140 µg/mL) que é um potente antioxidante um análogo da vitamina E utilizado como controle positivo que reduziu em 50,96% na produção de nitrito. Para esse íon a CE_{50} inibitória encontrada foi de 0,106 µg/mL com intervalo de 95% de confiança variando de 0,049 a 0,230 µg/mL.

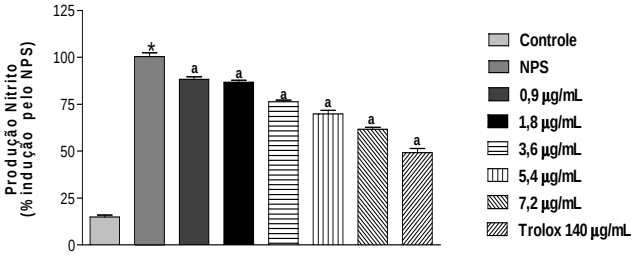


Figura 1 Potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel contra a formação do íon nitrito. Potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel contra a formação do óxido nítrico. Valores representam média ± E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5). $^{a}p<0,001$ *versus* NPS; $^{*}p<0.001$ *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Avaliação da potencial antioxidante *in vitro* contra a formação do radical hidroxila

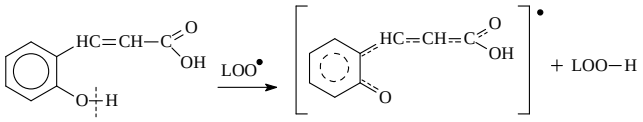
Em nossos resultados foi evidenciada uma diminuição significativa na degradação da 2-desoxiribose sugerindo a capacidade de sequestrar o radical hidroxila do extrato de *M. glomerata* Sprengel de acordo com a equação 4 da Figura 2 na degradação da desoxiribose, detectada pela formação do malonaldeído (MDA) que ao reagir com o

ácido tiobarbitúrico forma cromógeno que absorve radiação no comprimento de onda 532 nm. A formação da substância cromógena está representada na Figura 3.

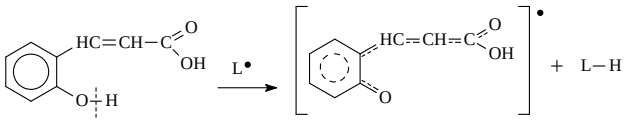
Nas concentrações testadas (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL) o extrato foi capaz de remover o radical hidroxila em 11,28; 21,76; 29,14; 32,53 e 47,5% respectivamente e o trolox (140 µg/mL) reduziu em 55,59% quando comparado ao sistema reacional. Nesse teste foi determinado um valor de CE_{50} inibitória de 1,872 µg/mL variando de 1,276 a 2,746 µg/mL com de intervalo de confiança de 95% (Figura 4).

Figura 2. Propostas dos possíveis mecanismos do potencial antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel.

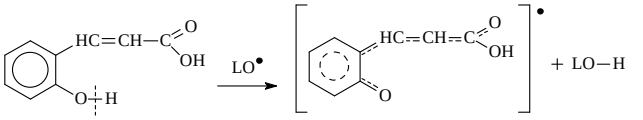
1) Radical peroxila



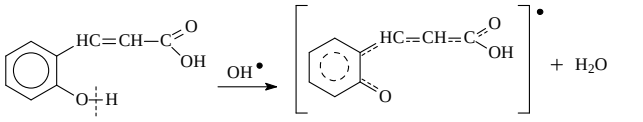
2) Radical alquila



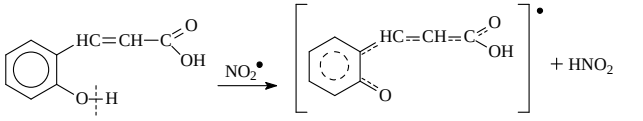
3) Radical alcoxila



4) Radical Hidroxila



5) Nitrito



6) Óxido Nítrico

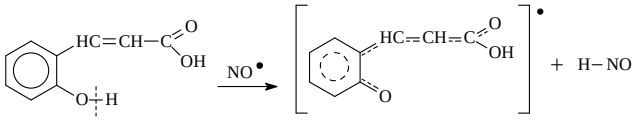


Figura 3. Formação do cromógeno a partir de ácido tiobarbitúrico e malonaldeído (Gulçin, 2012).

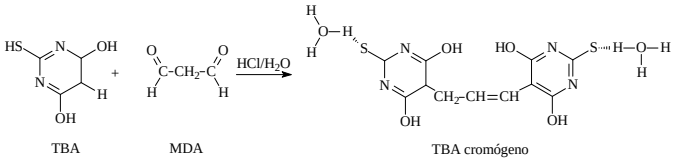
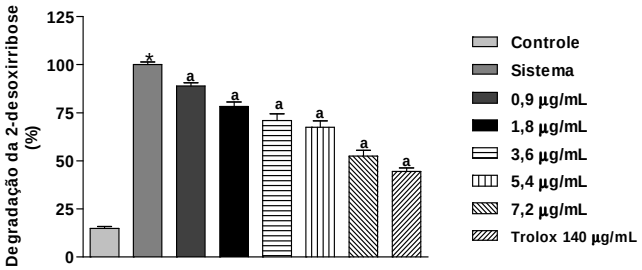


Figura 4. Potencial antioxidante do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel contra a formação do radical hidroxila *in vitro*



Inibição da formação do radical hidroxila *in vitro* pelo extrato da *M. glomerata* Sprengel, controle e padrão Trolox. Valores representam média ± E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5). [a]p<0,001 *versus* meio reacional; [*]p<0.001 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este ensaio é baseado na diminuição da intensidade de fluorescência de uma molécula, neste caso TBARS sob o fluxo de radicais peroxila, gerado da decomposição de AAPH (**Figura 5)**, essas reações ilustram isso R-N=N-R → N2 + ROO e ROO + Probe fluorescente → ROOH + Probe não fluorescente (Gulçin 2012). Na presença do antioxidante como a cumarina e o ácido *o*-hidroxicinâmico ocorre o sequestro do radical peroxila como mostra a reação 1 da Figura 2.

O extrato de *M. glomerata* Sprengel diminuiu os níveis de peroxidação lipídica *in vitro* e promoveu a inibição de 50% com TBARS com um valor de CE_{50} inibitória de 1,102 µg/mL variando de 0,623 a 1,949 µg/mL com intervalo de 95% de confiança.

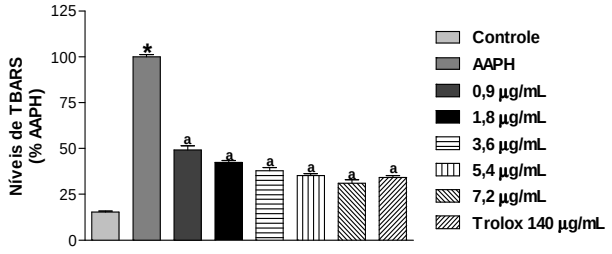
Na Figura 5 pode ser observado que o extrato reduziu significativamente a produção de TBARS em comparação ao AAPH, apresentado 50,77; 57,66; 62,05; 64,79 e 68,97% nas concentrações testadas de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL. A concentração de 7,2 µg/mL apresentou uma redução de TBARS maior que o trolox (65,80%) agente antioxidante utilizado como controle positivo.

Baseado nos resultados obtidos foi elaborado uma proposta para os possíveis mecanismos do potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *M. glomerata* Sprengel mais especificamente duas substâncias ativas presentes no extrato (cumarina e *o*-hidroxicinâmico). A cumarina ao sofrer hidratação forma o ácido *o*-hidroxicinâmico, sendo,

assim, a estrutura de ressonância para estabilizar radicais provenientes de seus potenciais antioxidantes (cumarina e ácido *o*-hidroxicinâmico) podem ser a mesma.

Ao atuar como antioxidante o ácido *o*-hidroxicinâmico doará preferencialmente o hidrogênio atômico ($H^{\cdot}$) da hidroxila fenólica para reduzir os radicais alvos livres e formará um novo radical de grande estabilidade como demonstra a Figura 2.

Figura 5. Potencial antioxidante do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel contra os níveis de TBARS *in vitro*.



Inibição da formação de TBARS *in vitro* pelo extrato da *M. glomerata* Sprengel, controle e padrão Trolox. Valores representam média ± E.P.M dos experimentos realizados em duplicata (n=5). [a]p<0,001 *versus* AAPH; [*]p<0.001 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel

Nos testes antimicrobianos realizados *in vitro* com o extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel foi verificado que a concentração inibitória mínima contra *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* corresponde a 10 mg/mL.

Dentre as concentrações testadas (5, 10 e 20 mg/mL) do extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel que apresentaram atividade antibacteriana, somente a concentração 20 mg/mL demonstrou também atividade bactericida.

Entretanto, deve ser ressaltado que houve uma redução significativa no número de bactérias após a adição do extrato etanólico nas concentrações 10 mg/mL, apesar de não terem apresentado atividade bactericida, sugerindo que nas maiores concentrações, o extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel pode apresentar esta atividade. O extrato etanólico padronizado de *M. glomerata* Sprengel apresentou efeito bactericida contra as cepas *S. aureus* ATCC, cepa clínica e *E. coli* clínica.

Estudos *in vitro* dos efeitos do extrato etanólico padronizado da *Mikania glomerata* Sprengel contra *S. mansoni*

O extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel reduziu a motilidade e causou a morte dos parasitas de forma diretamente dependente da concentração e do tempo de incubação. A mortalidade dos helmintos adultos ocorreu com extrato etanólico a partir de 300 µg/mL (Tabela 3).

Os parasitas permaneceram acasalados durante todo o período de incubação e, comparativamente aos vermes controles incubados apenas em meio de cultura, não houve redução na oviposição quando expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico (300 a 1000 µg/mL).

O tegumento das espécies de *Schistosoma* é um dos principais alvos para drogas esquistossomicidas. Nesse sentido, o tegumento dos parasitas foi analisado por microscopia confocal de varredura a laser após exposição ao extrato etanólico padronizados das folhas de *M. glomerata* Sprengel.

Tabela 3. Efeito do extrato etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel na viabilidade e atividade motora de *Schistosoma mansoni*.

Extrato padronizado (µg/mL)	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)[a]	Redução na atividade motora (%)[a]	
			Leve	Significativa
0[b]	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
	120	0	0	0
300	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	80	100
	120	90	0	100
400	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	80	20
	120	100	0	100
500	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	20	0
	96	0	50	30
	120	100	0	100
750	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	20	0
	96	100	0	100
	120	100	0	100
1000	24	0	0	0
	48	0	20	80
	72	100	0	100
	96	100	0	100
	120	100	0	100
PZQ[c]	24	100	0	100

[a]Porcentagem em relação a 20 vermes; [b]Em DMSO 1% no meio RPMI; [c]Controle positivo: Praziquantel (PZQ 5µg/mL). Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Como demonstrado na figura 6, comparativamente a vermes controles incubados apenas em meio de cultura, foi possível constatar que, nas concentrações letais, o extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel causou alterações morfológicas no tegumento dos adultos de *S. mansoni*.

DISCUSSÃO

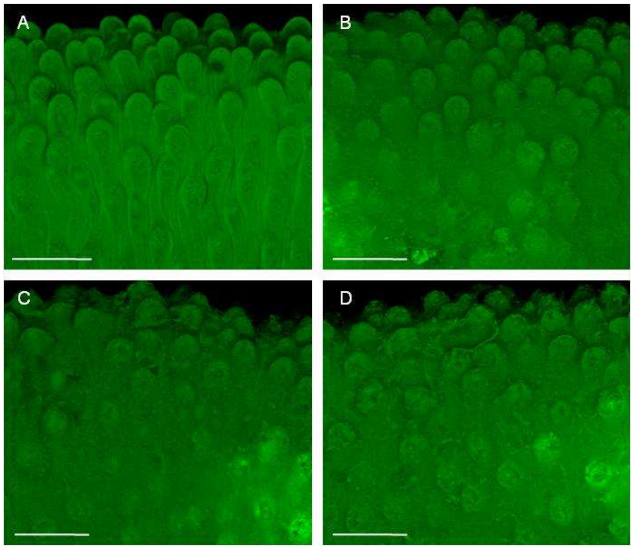
A *M. glomerata* Sprengel apresenta estudos científicos que comprovam atividades farmacológicas como bactericida, antiofídica, antialérgica, antifúngica, antiinflamatória, antimalárica, broncodilatadora e ansiolítica (Fierro et al. 1999; Holetz et al. 2002; De Moura et al. 2002; Falcão et al. 2005; Maiorano et al. 2005; Dos Santos et al. 2006; Botsaris 2007; Santana et al. 2013).

Na literatura os testes já realizados para descrever o potencial antioxidante da *M. glomerata* Sprengel foram realizados com a tintura e o extrato dessa espécie pelo

método DPPH (Oliveira et al., 2008). Dessa forma, com o intuito de realizar protocolos mais específicos e confiáveis foram feitos os ensaios para determinar o nível de peroxidação lipídica, da captura do íon nitrito e dos danos à desoxirribose para avaliar a capacidade do extrato de proteger contra o estresse oxidativo.

A avaliação do potencial antioxidante da tintura foi realizada por Vicentino e Menezes (2007) e segundo esses autores a tintura de *M. glomerata* Sprengel apresentou fraco potencial antioxidante pelo método DPPH, porém ainda de acordo com esses mesmos autores, novos estudos devem ser realizados para confirmar ou não o potencial antioxidante dessa espécie.

Figura 6**.** Efeito do extrato etanólico padronizado de *Mikania glomerata* Sprengel no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo acetato de carvacrol em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss). **A**: controle, sem adição do extrato. **B**: 300 µg/mL. **C**: 500 µg/mL. **D**: 1000 µg/mL. A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

Posteriormente, Oliveira e colaboradores (2008) realizaram testes para determinar o potencial antioxidante de extratos da *M. glomerata* Sprengel e os resultados encontrados por esses autores corroboram com os nossos. Além disso, em nossos estudos foram realizados métodos complementares que ajudam a confirmar esse potencial. Durante o teste para verificar o nível de peroxidação lipídica na presença do extrato *M. glomerata* Sprengel foi verificado um potencial antioxidante semelhante ao Trolox.

Complementando o nosso estudo e após confirmar o potencial antioxidante do extrato foram avaliadas as suas atividades antimicrobiana e esquistossomicida, visto que o potencial contra o estresse oxidativo pode estar envolvido na proteção contra infecções causadas por helmintos e microrganismos. De acordo com nossos estudos o extrato etanólico apresentou efeito bactericida contra as cepas *S. aureus* ATCC, cepa clínica e *E. Coli* clínica. Contraditoriamente ao nosso estudo, Duarte e colaboradores (2007) e Oliveira e colaboradores (2007) encontraram em seus estudos que a *M. glomerata* Sprengel não apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli, A. hydrophila, B. subtilis, P. aeruginosa e S. aureus*. Por outro lado, estudos realizados por Yatsuda e colaboradores (2005) demonstram que cepas mutantes de Streptococcos foram sensíveis aos efeitos das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*.

No presente estudo foi avaliado também o efeito do extrato etanólico de *M. glomerata* Sprengel na viabilidade dos adultos de *S. mansoni*, visto que atualmente, a busca por produtos naturais com ação esquistossomicida tem sido incentivada (Allegretti et al. 2012; Moraes 2012). Como mostrado na Tabela 3, nosso extrato vegetal padronizado causou ação antihelmíntica em machos de fêmeas de *S. mansoni*. As diferenças na susceptibilidade entre os pares de *S. mansoni* são assinaladas na literatura com diferentes produtos naturais. Entre eles, por exemplo, Sanderson e colaboradores (2012) relataram que os vermes machos são mais susceptíveis que as fêmeas quando em presença de extratos de rizoma de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae).

Por outro lado, Mitsui e colaboradores (2009) assinalaram que os fêmeas são mais susceptíveis que os machos nos experimentos com artenusato, um derivado de artemisina, princípio ativo de *Artemisia annua* (Asteraceae). Já no presente estudo, pode ser observado que o extrato etanólico *M. glomerata* Sprengel é eficaz contra os adultos de *S. mansoni* sem diferenças na taxa de mortalidade entre machos e fêmeas. Corroborando com nossos resultados, não houve diferenças entre os pares de *S. mansoni* quando expostos à piplartina, uma amida isolada de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) (Moraes et al. 2011) e à epiisopiloturina, um alcaloide isolado de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) (Veras et al. 2012).

O mecanismo de ação do extrato de *M. glomerata* contra *S. mansoni* ainda é desconhecido. No entanto, é sabido que o tegumento dos esquistossomos é especializado para proteção, absorção e secreção, além de ser considerado um importante alvo para drogas (Moraes, 2012). Alguns antihelmínticos promissores assinalados recentemente na literatura como ácido araquidônico (El Ridi et al. 2010), mefloquina (Manneck et al. 2010) e miltefosina (Eissa et al. 2011), incluindo os de origem natural como, por exemplo, o alcalóide epiisopiloturina (Veras et al. 2012), o peptídeo antimicrobiano dermaseptina 01 (de Moraes et al. 2011) e os óleos essenciais de *Piper cubeba* (Piperaceae) (Magalhães et al. 2012) e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (Parreira et al. 2010) são capazes de induzir alterações morfológicas no tegumento.

Nesse contexto, com objetivo de realizar uma análise mais detalhada sobre o efeito do extrato de *M. glomerata* Sprengel no tegumento de *S. mansoni*, os parasitas foram analisados por microscopia confocal de varredura a laser. Como mostrado na Figura 6, o extrato etanólico afetou o tegumento dos adultos de *S. mansoni;* e nas concentrações letais foram observados danos nos tubérculos e formação de bolhas na superfície dos parasitas machos. Portanto, a morte dos parasitas pode ser associada à lesão no tegumento.

Dessa forma, estes dados sugerem que o extrato etano-

lico padronizado avaliados nos protocolos experimentais descritos anteriormente apresenta potencial antioxidante e efeito farmacológico contra doenças negligenciadas como a esquistossomose e infecções bacterianas. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer seu mecanismo de ação e a correlação entre os efeitos farmacológicos e o potencial antioxidante dessa espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Pedro L. S. Pinto e Dra. Cybele Gargioni (Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP), pela manutenção e fornecimento do *S. mansoni*. Ao Sr. Alexsander S. Souza e Dr. Ronaldo Z. Mendonça (Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP), pelo uso do microscópio confocal. Os autores agradecem, também, a FAPEPI, FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Allegretti SM, Oliveira CNF, Oliveira RN, Frezza TF, Rehder VLG. The use of Brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*. In: Rokni MB. ed. Schistosomiasis. InTech. Rijeka: p. 27-70, 2012.

Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *J Ethnobiol Ethnomed* v.1, p.13-18, 2007.

Camargo EV. Atividade de neutrófilos e estresse oxidativo em cordeiros infectados experimentalmente com *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 47pp, 2009.

Cansian RL, Mossi AJ, Paroul N, Toniazzo G, Zboralski F, Prichoa FC, Kubiak GB Lerin LA. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de Canela-sassafrás (*Octotea odorífera* (Vell.) Rowher). *Perspectiva* v.34, p.123-33, 2010.

Cunha GMM. Alterações nas concentrações de SRAT, Conteúdo de GSH e atividade da CAT em pacientes com esquistossomose aguda. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 67pp, 2008.

De Moraes J, Nasciemento C, Miura LM, Leite JR, Nakano E, Kawano T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. *Chem Biodivers* v.8, p.548-558, 2011.

De Moraes J, Carvalho AA, Nakano E, Almeida AA, Marques TH, Andrade LN, Freitas RM, Sousa DP. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* v.112, n.2, p.603-610, 2013.

De Moura RS, Costa SS, Jansen JM, Silva CA, Lopes CS, Bernardo Filho M, Silva VN, Criddle DN, Nunes BP, Rubenich LMS, Araújo RG, Carvalho LCRM. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol* v.54, p.249-256, 2002.

Dos Santos SC, Krueger CL, Steil AA, Krueger MR, Biavatti MW, Wisniewski Junior A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Med* v.72, p.679-684, 2006.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Etnopharmacol* v.111, p.197-201, 2007.

Eissa MM, El-azzouni MZ, Amer EI, Baddour NM. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. *Int J Parasitol* v.41, p.235-242, 2011.

El Ridi R, Aboueldahab M, Tallima H, Salah M, Mahana N, Fawzi S, Mohamed SH, Fahmy OM. *In vitro* and *in vivo* activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Antimicrob Agents Chemother* v.54, p.3383-3389, 2010.

Esterbauer H, Cheeseman KH 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* v.186, p.407-421, 1990.

Falcão HS, Lima IO, Dos Santos VL, Dantas HF, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM, Batista LM. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev Bras Farmacogn* v.15, p.381-391, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª edição. São Paulo. Atheneu, 1988.

Fierro IM, Da Silva AC, Lopes CS, De Moura RS, Barja-Fidalgo C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* v.66, p.19-24, 1999.

Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antoniolli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JPA, Rocha RF, Moreira JCF, Araújo AA, Gelainn DP, Quintans-Júnior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* v.107, p.949-957, 2010.

Gulçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* v.86, p.345-391, 2012.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Vataru CN, Dias Filho, BP. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.97, p.1027-1031, 2002.

Kumate J. Infectious disease in the 21 century. *Arch Med Res* v.28, p.155-161, 1997.

Lopes GKB, Schulman HM, Lima MH. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* v.1472, p.142-152, 1999.

Maiorano AV, Marcussi S, Daher MA, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes AO, França SC, Soares AM, Pereira OS. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* v.102, p.364-370, 2005.

Magalhães LG, De Souza JM, Wakabayashi KA, Laurentiz SRDA, Vinhólis AH, Rezende KC, Simaro GV, Bastos JK, Rodrigues V, Esperandim VR, Ferreira DS, Crotti AE,

Cunha WR, Silva ML. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* v.110, p.1747-1254, 2012.

Manneck T, Haggenmuller Y, Keiser J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 137: 85-98, 2010.

Marques THC, Cardoso KMF, Almeida AAC, Tomé AR, Freitas RM. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with Bellis *perennis* in pilocarpine-induced seizures. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát.*, 10: 338-344, 2011.

Mitsui Y, Miura M, Aoki Y. *In vitro* effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol* v.83: p.7-11, 2009.

Moraes J, Silva MP, Ohlweller FP, Kawano T 2009. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop* v.51, p.77-82, 2009.

Moraes J, Nascimento C, Lopes PO, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, Kawano T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. *Exp Parasitol* v.127, p.357-364, 2011.

Moraes J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales, A.J. ed. Current Topics in Tropical Medicine. In: Tech. Rijeka: p. 333-358, 2012.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.* NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

Oliveira DF, Pereira AC, Figueiredo HCP, Carvalho DA, Silva G, Nunes AS, Alves DS, Carvalho HWP 2007. Antibacterial activity of plants extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia* v.78, p.142-145, 2007.

Oliveira MS, Sawaya ACHF, Ribeiro MCM. Avaliação da atividade antioxidante de extratos de Guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). I Jornada Científica e Tecnológica UNIBAN, São Paulo, 2008.

Parreira NA, Magalhães LG, Morais DR, Caixeta SC, De Sousa JP, Bastos JK, Cunha WR, Silva ML, Nanayakkara NP, Rodrigues V, Da Silva Filho AA. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers* v.7, p.993-1001, 2010.

Sanderson L, Bartlett A, Whitfield PJ. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. *J Helminthol* v.76, p.241–247, 2002.

Santana LCLR, Brito MRM, Lima LS, David JM, David JPL, FREITAS RM. Evaluation of the anxiolytic effect of the standardized ethanolic extract of leaves from *Mikania glomerata* Spreng. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2013 – in press.

Smithers SR, Terry RJ. A infecção dos exércitos de laboratório com cercárias de *Schistosoma mansoni* e a recuperação dos vermes adultos. *Parasitol* v.55, p.695-700, 1965.

Sorg O. Oxidative stress: a theoretical modelor biological reality? *C R Biol* v.327, p.649-662, 2004.

Veras LM, Guimarães MA, Campelo YD, Vieira MM, Nascimento C, Lima D, Vasconcelos L, Nakano E, Kuckelhaus S, Batista MC, Leite JR, Moraes J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Curr Med Chem* v.19, p.2051-2058, 2012.

Vicentino ARR, Menezes FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia DPPH. *Rev Bras Farmacogn* v.17, p.384-387, 2007.

Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VLG, Melo LV, Koo H. Effects of Mikania genus plants on growth and cel adherence of mutants streptococci. *J Etnopharmacol* v.97, p.183-189, 2005.