



CUBEBINA ISOLADA DE *DRIMYS ANDINA*: EXPLORANDO A BIODIVERSIDADE  
COMO FONTE DE INOVAÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA *ANGIOSTRONGYLUS*  
*CANTONENSIS*

Thainá Rocha Teixeira, Bruna Lima Lemes, Monique Cunha Amaro, Cristian Paz

Josué de Moraes

Universidade Guarulhos

Guarulhos – São Paulo

2025

## Resumo

A angiostrongilíase humana, causada por *Angiostrongylus cantonensis*, constitui uma zoonose emergente de relevância crescente para a saúde pública, sobretudo em áreas urbanas onde moluscos invasores, como o caramujo-gigante-africano (*Achatina fulica*), atuam como hospedeiros intermediários, com impactos significativos sobre os ecossistemas e sobre a saúde ambiental. A intensificação da urbanização, aliada às mudanças climáticas, favorece a expansão desses hospedeiros e, conseqüentemente, a disseminação do parasita, configurando um risco progressivo à população. Diante das limitações dos tratamentos convencionais, ganha destaque a busca por estratégias inovadoras baseadas em compostos naturais para prevenção e controle de helmintíases. Nesse contexto, a cubebina, uma lignana isolada de espécies do gênero *Piper*, foi investigada quanto à sua eficácia *in vitro* frente a larvas L1 e L3 de *A. cantonensis*, bem como à sua citotoxicidade em células hospedeiras. Os ensaios experimentais revelaram efeitos sobre o parasita, induzindo alterações morfológicas compatíveis com estresse e morte, ao mesmo tempo em que apresentou baixa toxicidade em células de mamíferos. A seletividade evidenciada reforça o potencial terapêutico da cubebina como alternativa segura e promissora derivada de produtos naturais. Esses achados ressaltam como a bioprospecção de recursos vegetais pode contribuir para a saúde ambiental e pública, mitigando riscos de zoonoses associadas a moluscos e promovendo abordagens terapêuticas sustentáveis em contextos impactados pelas mudanças climáticas. Para consolidar sua aplicação clínica, são necessários estudos futuros envolvendo ensaios *in vivo* e avaliação farmacocinética.

**Palavras-chave:** Cubebina, *Angiostrongylus cantonensis*, antiparasitário.

## Abstract

Human angiostrongyliasis, caused by *Angiostrongylus cantonensis*, is an emerging zoonosis of growing public health relevance, particularly in urban areas where invasive mollusks, such as the giant African snail (*Achatina fulica*), serve as intermediate hosts, significantly impacting ecosystems and environmental health. The intensification of urbanization, combined with climate change, promotes the expansion of these hosts and, consequently, the spread of the parasite, representing a progressively increasing risk to the population. Given the limitations of conventional treatments, there is increasing interest in innovative strategies based on natural compounds for the prevention and control of helminthiasis. In this context, cubebin, a lignan isolated from species of the genus *Piper*, was investigated for its *in vitro* efficacy against L1 and L3 larvae of *A. cantonensis*, as well as for its cytotoxicity in host cells. Experimental assays revealed effects on the parasite, inducing morphological changes consistent with stress and death, while exhibiting low toxicity in mammalian cells. The observed selectivity underscores cubebin's therapeutic potential as a safe and promising natural product-derived alternative. These findings highlight how the bioprospecting of plant resources can contribute to environmental and public health, mitigating zoonotic risks associated with mollusks and promoting sustainable therapeutic approaches in contexts impacted by climate change. To consolidate its clinical application, future studies involving *in vivo* assays and pharmacokinetic evaluation are required.

**Keywords:** Cubebin, *Angiostrongylus cantonensis*, antiparasitic.

## 1. Introdução

As infecções por nematoides parasíticos representam um importante problema de saúde global, afetando milhões de humanos e animais ao redor do mundo (Prociv *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2016). Entre esses parasitas, *Angiostrongylus cantonensis* (verme pulmonar de rato) destaca-se como um agente zoonótico emergente de relevância clínica. A infecção humana ocorre acidentalmente pela ingestão de caramujos, lesmas ou hospedeiros paratênicos (como camarões, rãs, lagartos e caranguejos), crus ou mal cozidos, ou alimentos contaminados com muco de moluscos infectados. Em humanos, o parasita não completa seu ciclo de vida e migra para o sistema nervoso central, onde morre e provoca uma intensa resposta inflamatória, levando à meningite eosinofílica, também chamada de neuroangiostrongilíase (Barbosa *et al.*, 2024; da Silva *et al.*, 2021; Graeff-Teixeira *et al.*, 2023).

A superfamília Metastrongyloidea inclui espécies de nematoides que parasitam principalmente mamíferos, infectando sistemas respiratório e cardiovascular, embora algumas espécies sejam neurotrópicas. A maioria das espécies metastrongilídeos, especialmente da família Angiostrongylidae, utiliza gastrópodes terrestres como hospedeiros intermediários, embora algumas possam parasitar gastrópodes de água doce (Valente *et al.*, 2020; Thiengo *et al.*, 2022). Além de animais silvestres, algumas espécies parasitam humanos e animais domésticos ou sinantrópicos, como *Angiostrongylus costaricensis*, causador da angiostrongilíase abdominal (Spratt, 2015; Neves, 2016).

O ciclo de vida de *A. cantonensis* envolve ratos (*Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*) como hospedeiros definitivos e diversas espécies de gastrópodes como intermediários. Os moluscos se infectam ao ingerirem larvas de primeiro estágio (L1) presentes nas fezes de roedores ou por penetração ativa das larvas, que se desenvolvem para o segundo e terceiro estágios larvais (L2 e L3) no tecido do hospedeiro (Graeff-Teixeira & Morera, 1995; Wallace & Rosen, 1969; Ash, 1970). Diversas espécies de moluscos estão naturalmente infectadas, como *Achatina fulica*, *Sarasinula marginata*, *Bradybaena similis*, *Subulina octona* e *Pomacea lineata*, contribuindo para a manutenção e

dispersão ambiental do parasita (Thiengo *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2014; Valente *et al.*, 2020).

O tratamento atual de infecções por nematoides, como o albendazol, apresenta eficácia limitada contra larvas migratórias nos tecidos, evidenciando a necessidade urgente de alternativas anti-helmínticas mais seguras e eficazes (Prociv *et al.*, 2000). Além de sua importância clínica, *A. cantonensis* constitui um modelo experimental valioso, devido à sua similaridade fisiológica com outros nematoides parasíticos e à sua adequação para ensaios *in vitro* padronizados (Moreira *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2020).

Produtos naturais, especialmente lignanas e sesquiterpenos, têm demonstrado potencial como agentes antiparasitários devido a mecanismos de ação distintos e menor risco de resistência cruzada. *Drimys andina* (Winteraceae), espécie endêmica do Chile e nativa dos Andes, apresenta flavonoides e sesquiterpenos drimânicos, sendo investigada como fonte de compostos bioativos contra nematoides (Macedo *et al.*, 2020; Mengarda *et al.*, 2021; Paz *et al.*, 2020).

Diante desse cenário, o presente estudo avaliou a atividade antiparasitária *in vitro* da cubebina contra larvas L3 e adultos de *A. cantonensis*, bem como sua citotoxicidade em células hospedeiras. Esta pesquisa integra inovação na descoberta de produtos naturais com considerações de saúde ambiental e pública, abordando os riscos associados a moluscos invasores e promovendo estratégias sustentáveis em territórios impactados por mudanças climáticas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a atividade antiparasitária da cubebina, isolada de *Drimys andina*, contra larvas L1 e L3 de *A. cantonensis*, considerando sua eficácia e segurança, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em produtos naturais.

## 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a eficácia *in vitro* da cubebina em diferentes concentrações sobre larvas L1 e L3 de *A. cantonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade da cubebina em linhagens celulares mamíferas (Vero e HaCaT);
- Investigar a toxicidade da cubebina no modelo *Caenorhabditis elegans*;
- Analisar propriedades farmacocinéticas e de *drug-likeness* da cubebina por meio de abordagem *in silico*;
- Fornecer subsídios para futuras pesquisas *in vivo* e para o desenvolvimento de produtos naturais antiparasitários inovadores.

## 3. Metodologia

### 3.1. Materiais Gerais

A cromatografia em coluna foi realizada utilizando gel de sílica Merck 60 e Sephadex LH-20 (25–100 µm; Aldrich, Santiago, Chile). O progresso da purificação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (TLC) com placas Merck Silica Gel 60F254 (Darmstadt, Alemanha), analisadas sob luz UV (254 nm) e posteriormente coradas com KMnO<sub>4</sub>. Os solventes e frações foram concentrados em rotavapor Büchi R100 a 45 °C. Todos os solventes foram previamente destilados e secos com agentes dessecantes adequados.

### 3.2. Extração e Purificação da Cubebina

Um total de 7.151 g de folhas frescas de *D. andina* foi coletado em Huincacara, Villarrica, Região da Araucanía, Chile (39°28'54.9"S, 71°45'24.3"W; 1.438 m de altitude) em janeiro de 2024. Um exemplar foi depositado no herbário da Universidad de La Frontera (DA-01–2024). O material vegetal foi lavado, seco em estufa a 50 °C por 2 dias e triturado em partículas menores que 2 mm.

O extrato bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica, eluído com gradiente hexano/acetato de etila, gerando 12 frações (F1–F12). A fração 9, contendo o composto de interesse, foi purificada por Sephadex LH-20 e cromatografia em coluna (40 mesh), eluída com hexano/EtOAc (3:2, v/v), resultando em 168 mg de cubebina sólida branca. A recristalização em EtOAc a 4 °C produziu cristais adequados para análise por difração de raios X (XRD).

### **3.3. Caracterização Química**

A cubebina foi caracterizada por espectroscopia de RMN 1D e 2D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC e NOESY) utilizando espectrômetro Bruker Avance Neo 500 MHz. Espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi realizada por EI-TOF (70 eV) em instrumento Waters Micromass.

### **3.4. Animais, Parasitas e Linhagens Celulares**

O ciclo de *A. cantonensis* (cepa NPDN-AC) foi mantido no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, UNG, utilizando *Biomphalaria glabrata* e *Achatina fulica* como hospedeiros intermediários, e ratos Wistar como hospedeiros definitivos. Animais foram mantidos em condições controladas (22 °C, ~50% umidade), com acesso ad libitum a alimento e água.

Células HaCaT (queratinócitos humanos) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, e células Vero (epitélio renal de macaco) da ATCC (CCL-81). As células foram cultivadas em DMEM suplementado com L-glutamina, penicilina, estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. *C. elegans* (cepa Bristol N2) foi mantido em placas NGM com *E. coli* OP50.

### **3.5. Ensaios Antiparasitários *in vitro***

Larvas de primeiro estágio (L1) foram isoladas das fezes de ratos infectados pelo método de sedimentação de Rugai e incubadas em placas de 96 poços com cubebina ou albendazol (controle positivo) em diluições seriadas a partir de 100 µM. Movimentos larvais foram avaliados a 24 h, classificando-se como imóveis, intermitentes, lentos ou altamente ativos. Eficácia ≥60% de imobilidade foi considerada significativa.

Larvas de terceiro estágio (L3) foram obtidas de *A. fulica* infectados por digestão artificial em solução HCl-pepsina, sedimentadas pelo método modificado de Rugai, e incubadas com cubebina ou albendazol em placas de 96 poços. Avaliação de viabilidade e motilidade foi realizada a 0 e 24 h.

### 3.6. Ensaios de Toxicidade e Citotoxicidade

- **C. elegans:** Larvas L4 foram incubadas em M9 com cubebina (1000  $\mu$ M inicial), ivermectina 10  $\mu$ M como controle positivo e 0,5% DMSO como negativo. Toxicidade foi definida como  $\geq 60\%$  de imobilidade.
- **Células hospedeiras:** Ensaios MTT foram realizados em placas de 96 poços com  $2 \times 10^3$  células/poço, expostas a cubebina (500  $\mu$ M inicial, diluições seriadas 3 $\times$ ). Doxorrubicina (15  $\mu$ M) foi controle positivo; 0,5% DMSO, negativo. Viabilidade foi medida a 595 nm após 24 h de incubação + 4 h com MTT.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

### 3.7. Análise *in silico*

Propriedades farmacocinéticas e *drug-likeness* foram avaliadas via SwissADME. Estruturas químicas foram desenhadas no Marvin JS e convertidas para SMILES. Parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foram previstos, bem como triagem PAINS.

### 3.8. Análise Estatística

Valores de EC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram calculados por curvas de dose-resposta sigmoidal não-linear usando GraphPad Prism 8. Diferenças entre grupos foram analisadas por ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey, com significância definida para  $p < 0,05$ .

## 4. Desenvolvimento

Este estudo reporta, pela primeira vez, a isolamento da cubebina em *D. andina*, uma espécie endêmica do Chile da família Winteraceae. Embora a cubebina já tenha sido

identificada em membros das famílias Piperaceae e Aristolochiaceae, sua presença em espécies de *Drimys* ainda não havia sido documentada (Rodríguez & Quezada, 1991; Ruiz et al., 2002). Este achado amplia o repertório fitoquímico conhecido de *D. andina* e reforça seu potencial como fonte de produtos naturais bioativos.

Os resultados estabelecem *D. andina* como uma nova fonte natural de cubebina, uma lignana dibenzilbutirolactona que apresentou atividade anthelmíntica potente contra larvas de *A. cantonensis*. Esses dados corroboram um corpo crescente de evidências que destaca o potencial terapêutico de lignanas e neolignanas em diferentes táxons vegetais. Por exemplo, *Drimys brasiliensis* produz metabólitos secundários ativos contra *Schistosoma mansoni* (Umehara et al., 2025; Souza et al., 2024), enquanto frutos ricos em cubebina de *Piper cubeba* apresentam atividade larvicida contra *Hemonchus contortus* (Borges et al., 2023). De maneira similar, neolignanas como a licarina A de *Nectandra oppositifolia* demonstram efeitos antiparasitários potentes com baixa citotoxicidade (Mengarda et al., 2023; Cirino et al., 2025). Esses achados reforçam a utilidade das lignanas como scaffolds antiparasitários promissores com perfis de segurança favoráveis.

A cubebina exibiu atividade anthelmíntica específica para estágios larvais, mostrando 2,7 vezes mais potência que o albendazol contra larvas L1 de *A. cantonensis*, mantendo eficácia comparável contra larvas L3 infectantes (Roquini et al., 2022; Roquini et al., 2024). O perfil de toxicidade confirmou a segurança da cubebina em células de mamíferos (linhagens Vero e HaCaT), sem citotoxicidade observada em concentrações de até 200 µM, resultando em índices de seletividade elevados, superiores a 42,5 para L1 e 13,1 para L3 — sugerindo uma ampla janela terapêutica (Roquini et al., 2022; Roquini et al., 2024). Esses resultados são consistentes com relatos de outras lignanas, como a licarina A e neolignanas de *S. cernuus*, que também apresentam atividade antiparasitária potente com baixa citotoxicidade em células de mamíferos (Mengarda et al., 2023; Cirino et al., 2025).

Além disso, a cubebina não apresentou toxicidade em *C. elegans*, um modelo *in vivo* amplamente utilizado para triagem inicial de toxicidade (Hunt, 2017). Curiosamente, lignanas de *Arctium lappa* têm demonstrado prolongar a vida útil de *C. elegans* por

mecanismos antioxidantes (Dias et al., 2017), sugerindo que a ausência de toxicidade da cubebina pode estar associada a propriedades citoprotetoras.

A análise in silico de ADME e drug-likeness reforça o potencial da cubebina como candidata a fármaco. O composto atende aos critérios de Lipinski, Veber e Ghose, apresentando peso molecular, lipofilicidade, área polar superficial e solubilidade favoráveis. Prediz-se alta absorção gastrointestinal e permeabilidade à barreira hematoencefálica, propriedades essenciais para o tratamento da neuroangiostrongilíase (Daina et al., 2017). A cubebina não foi identificada como substrato da P-glicoproteína, reduzindo o risco de resistência mediada por efluxo, e passou em todos os filtros PAINS e Brenk, indicando baixo risco de efeitos off-target (Daina et al., 2017). Essas características farmacocinéticas e de segurança são consistentes com outras lignanas, como a licarina A, que combina perfis favoráveis de ADME com potente atividade antiparasitária (Mengarda et al., 2023; Cirino et al., 2025).

## **5. Considerações Finais**

Em conclusão, a cubebina surge como um promissor candidato antelmíntico, apresentando alta seletividade, eficácia específica por estágio larval e propriedades favoráveis de *drug-likeness*. Sua identificação em *D. andina* enriquece o panorama fitoquímico da família Winteraceae e reforça a importância das lignanas na descoberta de fármacos antiparasitários. Estudos futuros devem focar na avaliação da eficácia *in vivo*, elucidação do mecanismo de ação e exploração do potencial sinérgico com tratamentos existentes, visando combater a resistência emergente em helmintos.

## Referências Bibliográficas

- Almeida, L. R.; Souza, J. G. R.; Santos, H. A.; Torres, E. J. L.; Vilela, R. V.; Cruz, O. M. S.; Rodrigues, L.; Pereira, C. A. J.; Maldonado Junior, A.; Lima, W. S. *Angiostrongylus minasensis* n. sp.: New species found parasitizing coatis (*Nasua nasua*) in an urban protected area in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2020, 29, e018119.
- Ash, L. R. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). *J. Parasitol.* 1970, 56, 249–253.
- Barbosa, T. A.; Thiengo, S. C.; Fernandez, M. A.; Ramos-de-Souza, J.; Gomes, S. R. The Zoonotic *Angiostrongylus cantonensis* and the Veterinary Parasite *Aelurostrongylus abstrusus* Infecting Terrestrial Gastropods from Urban Areas of Macapá, Brazilian Amazon Region. *Pathogens* 2024, 13, 255.
- Cirino, M. E.; Teixeira, T. R.; Silva, A. M. H.; Borges, A. C. C.; Fukui-Silva, L.; Wagner, L. G.; Fernandes, C.; McCann, M.; Santos, A. L. S.; de Moraes, J. Anthelmintic activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs. *Sci. Rep.* 2025, 15, No. 4699.
- da Silva, A. J.; Morassutti, A. L. *Angiostrongylus* spp. (Nematoda; Metastrongyloidea) of global public health importance. *Res. Vet. Sci.* 2021, 135, 397–403.
- Graeff-Teixeira, C.; Morera, P. Método de digestão de moluscos em ácido clorídrico para isolamento de larvas de Metastrongilídeos. *Biociências* 1995, 3, 85–89.
- Graeff-Teixeira, C.; Sawanyawisuth, K.; Lv, S.; Sears, W.; Rodríguez, Z. G.; Álvarez, H. H.; Arias, P. C.; Schultz, L. K. W.; Rojas, A.; Jacob, J.; Jarvi, S.; Kramer, K. International Network on Angiostrongyliasis—INA. Neuroangiostrongyliasis: Updated Provisional Guidelines for Diagnosis and Case Definitions. *Pathogens* 2023, 12, No. 624.
- Kim, J. R.; Hayes, K. A.; Yeung, N. W.; Cowie, R. H. Diverse Gastropod Hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm, Globally and with a Focus on the Hawaiian Islands. *PLoS ONE* 2014, 9, e94969.

Macedo, A.; Martorano, L.; Ferreira de Albuquerque, A. C.; Fiorot, R.; Carneiro, J.; Campos, V.; Vasconcelos, T.; Valverde, A.; Moreira, D. Martins dos Santos Junior F. Absolute configuration of (–)-cubebin, a classical lignan with pharmacological potential, defined by means of chiroptical spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.* 2020, 31, 2030–2037.

Mengarda, A. C.; Silva, M. P.; Cirino, M. E.; Morais, T. R.; Conserva, G. A. A.; Lago, J. H. G.; de Moraes, J. Licarin A, a neolignan isolated from *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. (Lauraceae), exhibited moderate preclinical efficacy against *Schistosoma mansoni* infection. *Phytother. Res.* 2021, 35, 5154–5162.

Mengarda, A. C.; Silva, T. C.; Silva, A. S.; Roquini, D. B.; Fernandes, J. P. S.; de Moraes, J. Toward anthelmintic drug candidates for toxocariasis: Challenges and recent developments. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, 251, No. 115268.

Moreira, V.; Giese, E.; Melo, F.; Simões, R.; Thiengo, S.; Maldonado Junior, A.; Santos, J. N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trop.* 2013, 125, 90–97.

Neves, D. P. *Parasitologia Humana*, 13th ed.; Atheneu: São Paulo, Brazil, 2016.

Paz, C.; Viscardi, S.; Iturra, A.; Marin, V.; Miranda, F.; Barra, P. J.; Mendez, I.; Duran, P. Antifungal effects of drimane sesquiterpene noids isolated from *Drimys winteri* against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020, 86, No. e01834–20.

Prociv, P.; Spratt, D.M.; Carlisle, M.S. Neuro-angiostrongyliasis: Unresolved issues. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1295–1303.

Roquini, D. B.; Lemes, B. L.; Kreutz, A. L. B.; Spoladore, S. C.; Amaro, M. C.; Lopes, F. B.; Fernandes, J. P. S.; de Moraes, J. Antihistamines H1 as potential anthelmintic agents against the zoonotic parasite *Angiostrongylus cantonensis*. *ACS Omega* 2024, 9, 31159–31165.

Roquini, D. B.; Silva, G. L.; Ferreira, L. L. G.; Andricopulo, A. D.; Wilairatana, P.; de Moraes, J. Susceptibility of *Angiostrongylus cantonensis* larvae to anthelmintic drugs. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, No. 901459.

Spratt, D. M. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2015, 4, 178–189.

Thiengo, S. C.; Ramos-de-Souza, J.; Silva, G. M.; Fernandez, M. A.; Silva, E. F.; Sousa, A. K. P.; Rodrigues, P. S.; Mattos, A. C.; Costa, R. A. F.; Gomes, S. R. Parasitism of terrestrial gastropods by medically-important nematodes in Brazil. *Front. Vet. Sci.* 2022, 9, 1023426.

Valente, R.; Robles, M. R.; Diaz, J. I. Gastropods as intermediate hosts of *Angiostrongylus* spp. in the Americas: Bioecological characteristics and geographical distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2020, 115, e200236.

Wallace, C. D.; Rosen, L. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacologia* 1969, 7, 427–438.

Webster, J.P.; Gower, C.M.; Knowles, S.C.L.; Molyneux, D.H.; Fenton, A. One health—an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol. Appl.* 2016, 9, 313–333.

**Declaração de Originalidade**

“Declaro, para os devidos fins, que este trabalho é original e que todas as fontes utilizadas foram devidamente referenciadas.”