



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Universidade Federal da Bahia  
- Ponto Focal -

Gláucio Barros Saldanha

**BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO PARA  
TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**

Salvador- Bahia

Setembro/2017

GLÁUCIO BARROS SALDANHA

**BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO PARA  
TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Juceni Pereira de Lima David

Salvador - Bahia

Setembro/2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

SALDANHA, GLÁUCIO BARROS  
BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO PARA TRATAMENTO  
DE HELMINTÍASE - BATH / GLÁUCIO BARROS SALDANHA. -- Salvador-  
Bahia, 2017.  
125 f.

Orientador: Juceni Pereira de Lima David.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
da Renorbio) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciência da Saúde, 2017.

1. Anti-helmíntica. 2. Camundongos Swiss fêmeas. 3.  
Neoflavonoides. 4. 4-di-hidrocumarina. 5. 7-acetoxi-4-aril-3.  
I. David, Juceni Pereira de Lima. II. Título.



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela  
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbioba@ufba.br](mailto:renorbioba@ufba.br)

### TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

**“Bioprospecção de um neoflavonoide sintético para tratamento de helmintíase-BATH”**

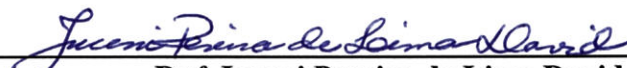
Elaborada por:

**GLÁUCIO BARROS SALDANHA**

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de  
**DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 14 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_

**Dr.ª Juceni Pereira de Lima David**

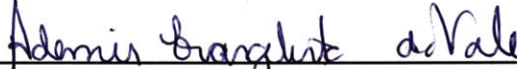
(Orientadora)

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_


**Dr. Hugo Neves Brandão**

Universidade Estadual de Feira de Santana

  
\_\_\_\_\_

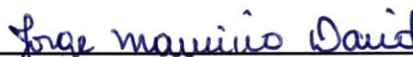
**Dr. Ademir Evangelista do Vale**

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_

**Dr. Fábio Alexandre Chinalia**

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_

**Dr. Jorge Mauricio David**

Universidade Federal da Bahia

\*\*\*\*\*

*“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)*

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)*

\*\*\*\*\*

*“Espelhe-se nos que superaram grandes adversidades e você vai aumentar suas chances de aprender seus caminhos”.*

*Flávio Augusto da Silva*

## ***Dedicatória***

*Dedico este trabalho aos meus familiares como maior exemplo de educadores e pela dedicação, esforço, responsabilidade e dignidade. Aos amigos que participaram de forma direta ou indiretamente e ao professor **Dr.Rivelilson Mendes de Freitas (In memoriam)**.*

## ***Agradecimentos***

*À Deus e a minha família.*

*Ao professor **Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (In memoriam)** e a professora **Dr. Juceni Pereira David** pela parceria, pelo conhecimento repassado e pela orientação.*

*Agradeço aos professores **Me. George Laylson da Silva Oliveira** e **Dr. Ana Paula dos Santos C. L da Silva** pelas suas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.*

*À **Universidade Federal do Piauí** pelas oportunidades proporcionadas.*

*À **Universidade Federal da Bahia** pelas oportunidades proporcionadas*

*À **Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)** pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia oferecido, oportunidade a mim concedida.*

.

*Aos **membros da banca** por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste estudo.*

*Agradeço a **todas as pessoas** que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.*



## RESUMO

SALDANHA, G.B. **BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO PARA TRATAMENTO DE HELMINTÍASE – BATH**. 2017. 125p. Orientador: Prof. Dra. Juceni Pereira de Lima David. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia.

Os neoflavonoides compreendem compostos que possuem um esqueleto básico de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) e que podem ser sintetizados ou ser encontrado naturalmente em plantas superiores como das famílias Clusiaceae, Leguminosae, Rubiaceae e Rutaceae. Os neoflavonoides têm atraído grande interesse devido às suas propriedades farmacológicas e bioquímicas apresentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em relação às doenças tropicais negligenciadas (DTNs), os neoflavonoides demonstraram ser promissoras moléculas bioativas no tratamento da leishmaniose, tripanossomose americana e malária. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para dar uma maior ênfase a sua ação farmacológica em outras doenças negligenciadas como a causada por vermes do gênero *Schistosoma*. Neste contexto farmacológico, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial quimioterapêutico do composto 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina, classificado como neoflavonoide, em um modelo experimental contra o *Schistosoma mansoni*. Além do estudo do potencial antiprotozoário, estudos não clínicos de segurança farmacológica foram realizados pela avaliação da toxicidade em dose única (14 dias) e em doses repetidas (28 dias) em camundongos *Swiss* fêmeas. O perfil de toxicidade aguda (300 e 2000 mg/kg) e em doses repetidas (250, 500 e 1000 mg/kg) foram realizados em camundongos *Swiss* fêmeas de acordo com a diretriz 423 e 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), respectivamente, pelos parâmetros relacionados às alterações do peso corporal, consumo de alimento e água, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Na avaliação farmacológica do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina (6,25, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) contra o *S. mansoni*, os parâmetros analisados foram a taxa de mortalidade, redução na atividade motora, número de ovos e alterações tegumentares. De acordo com experimentos realizados, foi demonstrado que o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina a partir da concentração de 12.5  $\mu\text{g/mL}$  induziu a mortalidade dos vermes *S. mansoni*, redução na atividade motora, mudanças na morfologia tegumentar e inibição na produção de ovos pela separação de todos os casais de vermes adultos tratados. A capacidade do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina de manter os vermes adultos machos e fêmeas separados demonstra ser a principal justificativa para elevada redução na oviposição de *S. mansoni*. Além da atividade quimioterapêutica, os resultados da toxicidade aguda e em doses repetidas de 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina demonstraram ausência de sinais clínicos adversos (contorções abdominais, reflexo de endireitamento, irritabilidade, piloereção), mortalidade, alterações significativas no peso corporal e dos órgãos internos, consumo de alimento e água. Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, plaquetas e leucócitos) e bioquímicos (glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, alanina aminotransaminase, aspartato aminotransaminase, colesterol, triglicerídeos) também não apresentaram alterações significativas quando comparado com os grupos controles dos estudos de toxicidade em dose única (aguda) e em doses repetidas. Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram atividade anti-helmíntica do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina e fornecem uma importante compreensão do perfil de toxicidade deste neoflavonoide, no qual pode ser considerado como sendo um composto com toxicidade superior a 2000 mg/kg em camundongos *Swiss* fêmeas.

**Palavras – chave:** Anti-helmíntica, camundongos *Swiss* fêmeas, Neoflavonoides, toxicidade, 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina.

## ABSTRACT

SALDANHA, G.B. **BIOPROSPECTION OF A SYNTHETIC NEOFLAVONOID FOR TREATMENT OF HELMINTHIASIS - BATH.** 2017. 125p. **Advisor:** Prof. Dra. Juceni Pereira de Lima David. Thesis – Post-Graduate Studies in Biotechnology, Rede Nordeste (Northeast Network) of Biotechnology, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia.

The neoflavonoid group comprise compounds that have a basic carbon skeleton (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) and that can be synthesized or be naturally found in families of higher plants such as the Clusiaceae, Leguminosae, Rubiaceae and Rutaceae families. Neoflavonoids have attracted great interest because of their pharmacological and biochemical properties presented in the *in vitro* and *in vivo* studies. In relation to neglected tropical diseases (NTDs), the neoflavonoids have been shown to be promising bioactive molecules in the treatment of leishmaniasis, American trypanosomiasis and malaria. Thus, additional studies are needed to give greater emphasis to their pharmacological action in other neglected diseases such as that caused by worms of *Schistosoma* genus. In this pharmacological context, the objective of the present study was to evaluate the chemotherapeutic potential of the 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin, classified as neoflavonoid, using an experimental model against *Schistosoma mansoni*. In addition to study the antiprotozoal potential, non-clinical pharmacological safety studies were performed by evaluating single dose (14 days) and repeated doses (28 days) toxicity in female *Swiss* mice. The acute toxicity profile (300 and 2000 mg/kg) and repeated doses (250, 500 and 1000 mg / kg) were performed in female *Swiss* mice according to guidelines 423 and 407 of the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), respectively, by the parameters related to changes in body weight, food and water consumption, as well as hematological and biochemical parameters. In the pharmacological evaluation of 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml) against *S. mansoni*, the parameters analyzed were the mortality rate, reduction in motor activity, number of eggs and tegumentary changes. According to experiments performed, it was demonstrated that the 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin from the concentration of 12.5 µg/mL induced the mortality of *S. mansoni* worms, the reduction in motor activity and, changes in tegumentary morphology and inhibition in egg production by separation of all couples of adult worms treated. The capacity of 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin to maintain separate male and female adult worms is shown to be the main justification for high reduction in *S. mansoni* oviposition. In addition to chemotherapeutic activity, the results of acute toxicity and repeated doses of 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin demonstrated no clinical adverse symptoms (abdominal contortions, righting reflex, irritability, piloerection), mortality, significant changes in body weight and internal organs, food and water consumption. The hematological parameters (analysis of erythrocyte, platelets and leukocytes) and biochemical parameters (glucose, urea, creatinine, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol, and triglycerides) also showed no significant changes when compared to the control groups. In conclusion, the results of the present study demonstrated *in vitro* anthelmintic activity of 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin and provide an important understanding of the toxicity profile of this neoflavonoid, in which it can be considered as a compound with toxicity greater than 2000 mg/kg in female *Swiss* mice.

**Keywords:** Anthelmintic, Female *Swiss* mice, Neoflavonoids, Toxicity, 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1:** DTNs com o número estimado de pessoas infectadas, mortes e áreas afetadas..... 18
- Figura 2:** Esquema da avaliação farmacológica do 7-acetoxi-4-aril-3,4-dihidrocumarina..... 19

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Taxonomia do verme *S. mansoni*..... 23
- Figura 2:** Morfologia do verme *S. mansoni*..... 24
- Figura 3:** Ciclo de transmissão de *S. mansoni*..... 25
- Figura 4:** Representação esquemática das manifestações clínicas aguda e crônica ocasionadas pelo parasita *S. mansoni*..... 26
- Figura 5:** Distribuição da prevalência da esquistossomose em nível mundial. A distribuição da esquistossomose não é regular sim focal. Adicionalmente, a vigilância para esquistossomose é limitada na maioria dos países. Portanto, este mapa máscara países inteiros onde a transmissão da esquistossomose tem sido relatada..... 29
- Figura 6:** Número de pessoas tratadas no Brasil (2006-2012)..... 30
- Figura 7:** Distribuição da prevalência da esquistossomose no Brasil (2005-2009).... 31
- Figura 8:** Estruturas químicas dos dois componentes do PZQ (mistura racêmica). A estrutura **(1a)** representa (*R*)-praziquantel e **(1b)** representa (*S*)-praziquantel. Átomo de carbono assimétrico destacado com um círculo nas duas estruturas químicas..... 32
- Figura 9:** Estrutura química da oxamniquina [1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-metiletil)aminometil-7-nitro-6-quinolinemetanol)..... 33
- Figura 10:** Diferentes estruturas químicas dos neoflavonoides..... 35

### CAPÍTULO I

- Figura 1:** Estrutura química básica dos flavonoides, isoflavonoides e neoflavonoides. As estruturas químicas desta classe de compostos são baseadas em um esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e da saturação do anel C (vermelho)..... 47
- Figura 2:** Neoflavonoides como compostos bioativos..... 64

## CAPÍTULO II

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda com camundongos <i>Swiss</i> .....   | 75 |
| <b>Figura 2:</b> Resultados do peso corporal de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (7-AADH, <b>A</b> ) no estudo de toxicidade aguda ( <b>B</b> ) e em doses repetidas em animais fêmeas ( <b>C</b> ) e machos ( <b>D</b> )..... | 80 |
| <b>Figura 3:</b> Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rins dos animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade em doses repetidas (28 dias).....                               | 90 |
| <b>Figura 4:</b> Porcentagem de mortalidade das <i>A. salina</i> na presença do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (7-AADH) em várias concentrações (6,25-100 µg/mL).....   | 91 |

## CAPÍTULO III

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1:</b> Desenvolvimento do ciclo de vida do helminto <i>S. mansoni</i> para obtenção de vermes adultos de ambos os sexos.....             | 103 |
| <b>Figura 2:</b> Procedimento da avaliação experimental das propriedades anti-helmíntica do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina.....            | 104 |
| <b>Figura 3:</b> Alterações tegumentares ocasionadas pelo 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina na região dorsal de <i>S. mansoni</i> machos..... | 108 |
| <b>Figura 4:</b> Efeito do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina na oviposição de fêmeas de <i>S. mansoni</i> .....                               | 109 |

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Casos positivos de esquistossomose registrados na Bahia de 2010 a 2013..... | 34 |
|--|----|

### CAPÍTULO I

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Estrutura química básica do 4-arilcumarina, 3,4-di-hidro-4-arilcumarina e neoflavene.....  | 48 |
| <b>Tabela 2:</b> Exemplos de medicamentos utilizados contra algumas DTNs e suas limitações.....   | 50 |
| <b>Tabela 3:</b> Nome, fórmula molecular e estrutura química dos neoflavonoides abordados no presente trabalho.....   | 52 |
| <b>Tabela 4:</b> Atividade antileishmaniana dos neoflavonoides derivados do (11) (-) mammea A/BB contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonenses</i> .... | 62 |

### CAPÍTULO II

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Efeitos do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina em animais no estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....   | 79 |
| <b>Tabela 2:</b> Resultados do consumo de ração, água, formação de urina e fezes de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina (7-AADH) durante o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias)..... | 82 |
| <b>Tabela 3:</b> Resultados do peso absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....                  | 84 |
| <b>Tabela 4:</b> Resultados dos parâmetros hematológicos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....                            | 86 |
| <b>Tabela 5:</b> Resultados dos parâmetros bioquímicos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).....                              | 87 |
| <b>Tabela 6:</b> Resultados da urinalise de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidro-cumarina (7-AADH) no estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas.....  | 88 |

### **CAPÍTULO III**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Efeitos <i>in vitro</i> do 7-acetoxi-4-amil-3,4-di-hidrocumarina contra <i>S. mansoni</i> adulto de 49 dias..... | 106 |
|---|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                  |  |
|------------------|--|
| ALT              | Alanina aminotransferase   |
| AST              | Aspartato aminotransferase   |
| ANOVA            | Análise de Variância   |
| DMAP             | Dimetilaminopiridina   |
| CHCM             | Concentração de hemoglobina corpuscular média                          |
| CI <sub>50</sub> | Concentração inibitória média  |
| CN               | Controle negativo  |
| COBEA            | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal                            |
| DTNs             | Doenças Tropicais Negligenciadas                                       |
| E.P.M.           | Erro padrão da média   |
| FAA              | Solução de água destilada, etanol, ácido acético e formaldeído         |
| HCM              | Hemoglobina corpuscular média  |
| HIV-1            | Vírus da imunodeficiência humana tipo 1                                |
| IL               | Interleucinas  |
| IFN- $\gamma$    | Interferon gama  |
| IV               | Espectroscopia no infravermelho  |
| OECD             | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico              |
| OMS              | Organização Mundial de Saúde   |
| PCE              | Programa de Controle do Programa da Esquistossomose                    |
| P&D              | Pesquisa e Desenvolvimento   |
| ppm              | Partespor milhão   |
| PubMed           | <i>U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health</i> |
| RMN              | Ressonância Magnética Nuclear  |
| RPMI             | <i>Roswell Park Memorial Institute, Invitrogen</i>                     |
| <i>SciFinder</i> | <i>Chemical Abstract on-line</i>                                       |
| SIDA             | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida                                 |
| SNC              | Sistema Nervoso Central  |
| SNA              | Sistema nervoso autônomo   |
| Th               | Célula T auxiliar  |
| UFPI             | Universidade Federal do Piauí  |
| VCM              | Volume corpuscular médio   |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>18</b> |
| Referências.....  | 20        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>22</b> |
| 2.1. Objetivo Geral.....  | 22        |
| 2.2. Objetivos Específicos.....   | 22        |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>23</b> |
| 3.1. Esquistossomose.....   | 23        |
| 3.1.1. <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon.....   | 23        |
| 3.1.2. Ciclo de transmissão.....  | 24        |
| 3.1.3. Manifestações clínicas.....  | 26        |
| 3.1.3.1. Fase aguda da esquistossomose.....   | 27        |
| 3.1.3.2. Fase crônica da esquistossomose.....   | 27        |
| 3.1.4. Esquistossomose e a necessidade de novos medicamentos.....   | 28        |
| 3.1.5. Prevalência da esquistossomose na Bahia.....   | 33        |
| 3.2. Neoflavonoides.....  | 35        |
| Referências.....  | 36        |
| <b>4. CAPÍTULO I: Neoflavonoides como compostos prospectivos para o<br/>tratamento de doenças tropicais negligenciadas e HIV.....</b>                     | <b>44</b> |
| Resumo.....   | 45        |
| 1. Introdução.....  | 46        |
| 2. Método de pesquisa e critérios de seleção.....   | 52        |
| 3. Resultados e Discussão.....  | 52        |
| 4. Conclusão.....   | 64        |
| Referências.....  | 65        |
| <b>5. CAPÍTULO II: Perfil toxicológico agudo e em doses repetidas do<br/>neoflavonoide 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina em camundongos Swiss....</b> | <b>70</b> |
| Resumo.....   | 71        |
| 1. Introdução.....  | 72        |



|  |            |
|--|------------|
| 2. Material e Métodos.....   | 73         |
| 3. Resultados.....   | 79         |
| 4. Discussão.....  | 91         |
| 5. Conclusão.....  | 94         |
| Referências.....   | 94         |
| <br>   |            |
| <b>6. CAPÍTULO III:Atividade anti-helmíntico 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina contra vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b> | <b>98</b>  |
| Resumo.....  | 99         |
| 1.Introdução.....  | 100        |
| 2. Material e Métodos.....   | 101        |
| 3. Resultados.....   | 106        |
| 4. Discussão.....  | 110        |
| 5. Conclusão.....  | 111        |
| Referências.....   | 112        |
| <br>   |            |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>118</b> |
| <b>PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>120</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>121</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Para a indústria farmacêutica, um dos maiores desafios continua sendo o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de uma variedade de doenças. Assim, um grande esforço da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos está sendo feito em parcerias acadêmicas e a razão para a implantação destas parcerias decorre da constatação de que, apesar de grandes investimentos nas últimas décadas, o número de novos medicamentos que chegam ao mercado permanece estável a um custo extremamente alto de investimento em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D), particularmente para o tratamento das doenças consideradas negligenciadas (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; WATTS, 2016).

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) afetam aproximadamente 1 bilhão de pessoas em aproximadamente 149 países e são responsáveis pela morte de milhões de pessoas anualmente (OMS, 2016). As DTNs apresentam várias causas em comuns e as mais conhecidas são a pobreza, falta de saneamento básico e serviços de saúde adequados. Dentre as DTNs mais prevalentes e que causam alta mortalidade e morbidade no mundo, pode ser destacado a filariose linfática, malária, oncocercose, helmintíases transmitidas pelo solo (ascaridíase), leishmaniose e esquistossomose (bilharzíase), na qual, são doenças que necessitam de novos medicamentos (Figura 1) (COHEN; SILVA, 2016).

**Figura 1:** DTNs com o número estimado de pessoas infectadas, mortes e áreas afetadas.

| DTNs                          | Pessoas infectadas globalmente <sup>1</sup> | Mortes <sup>2</sup> |
|-------------------------------|---|---------------------|
| Ascaridíase                   | 807 milhões                                 | 0,05 milhões        |
| Ancilostomose                 | 576 milhões                                 | 22,1 milhões        |
| Esquistossomose               | 207 milhões                                 | 0,2 milhões         |
| Filariose linfática           | 120 milhões                                 | 5,8 milhões         |
| Oncocercose                   | 37 milhões                                  | 0,5 milhões         |
| Leishmaniose                  | 12 milhões                                  | 0,7 milhões         |
| Ásia, África e América Latina |   |                     |

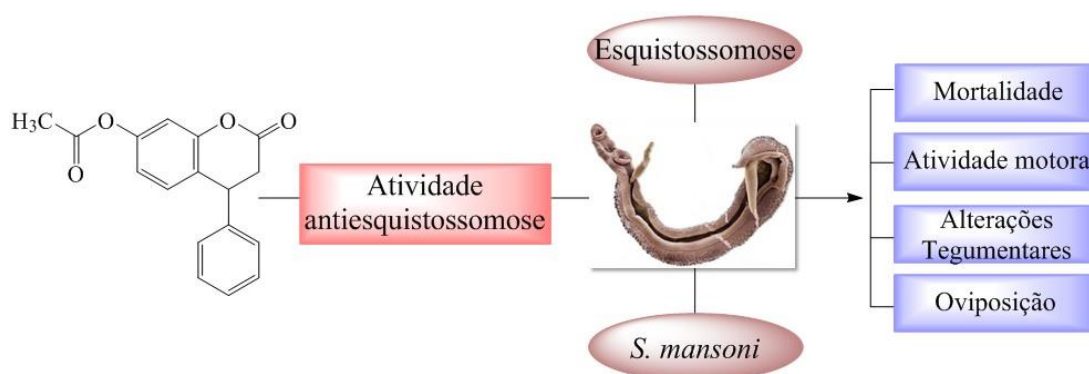
Fonte: Fenwick (2012)<sup>1</sup> e Lozano et al. (2012)<sup>2</sup>

O tratamento das DTNs impõe muitos encargos financeiros e por isso existe ainda pouco incentivo no mercado privado para desenvolver novos tratamentos, sendo exatamente um problema fundamental como induzir as empresas farmacêuticas a investir em P&D para novos medicamentos (LEE; BARTSCH; GORHAM, 2015). A falta de investimentos ocorre porque a maioria das DTNs afeta principalmente a parte da população mundial mais pobre e, mesmo havendo uma demanda em potencial para novos medicamentos de acordo com os números de pessoas infectadas e que estão em risco, as indústrias farmacêuticas resistem em fazer investimentos, já que, o valor de mercado dos medicamentos é baixo e porque os afetados não podem pagar pelos medicamentos (KLUG et al., 2016; LAURSEN, 2016).

Como dito anteriormente, mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo são afetadas pelas tradicionais DTNs e a descoberta de novos medicamentos exigem investimentos e grandes esforços por parte das indústrias farmacêuticas, mas os laboratórios acadêmicos por meio de parcerias estão se tornando cada vez mais ativos nos esforços pelo desenvolvimento de novas pesquisas para o tratamento de doenças que afetam as populações mais vulneráveis do mundo (MERRIFIELD et al., 2016; WATTS, 2016).

Em relação às DTNs abordadas na **Figura 1 (p. 18)**, a esquistossomose está entre as mais prevalentes e prejudiciais no mundo, na qual é causada por helmintos do gênero *Schistosoma* que ameaça aproximadamente 700 milhões de pessoas por viverem em áreas endêmicas (OMS, 2016a). Apesar de vários medicamentos disponíveis, apenas um tem sido escolhido para o tratamento da esquistossomose: o praziquantel. Portanto, sabendo da necessidade de novas substâncias que possam ser utilizadas para o tratamento das DTNs, especificamente a esquistossomose, uma das principais justificativas para a realização desta tese de doutorado intitulado “**BIOPROESPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO PARA TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**”, consiste em avaliar o potencial quimioterapêutico do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina contra *S. mansoni* (**Figura 2**).

**Figura 2:** Esquema da avaliação farmacológica do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina.



## Referências

- COHEN, J. P.; SILVA, L.; COHEN, A.; AWATIN, J.; STURGEON, R. Progress Report on Neglected Tropical Disease Drug Donation Programs. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1193-1204, 2016.
- FENWICK, A. The global burden of neglected tropical diseases. **Public Health**, v. 126, n. 3, p. 233-236, 2012.
- FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. **Drug Discovery Today**, *In press*, 2016.
- KLUG, D. M.; GELB, M. H.; POLLASTRI, M. P. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 11, p. 2569-2576, 2016.
- LAURSEN, L. Tropical disease: A neglected cause. **Nature**, v. 533, n. 7602, p. S68-S69, 2016.
- LEE, B. Y.; BARTSCH, S. M.; GORHAM, K. M. Chapter Eight - Economic and Financial Evaluation of Neglected Tropical Diseases. In: ROY, M. A. e MARIA GLORIA, B. (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v. Volume 87, 2015. p.329-417.
- LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALMAZROA, M. A.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BHALLA, K.; BIKBOV, B.; ABDULHAK, A. B.; BIRBECK, G.; BLYTH, F.; BOLLIGER, I.; BOUFOUS, S.; BUCELLO, C.; BURCH, M.; BURNEY, P.; CARAPETIS, J.; CHEN, H.; CHOU, D.; CHUGH, S. S.; COFFENG, L. E.; COLAN, S. D.; COLQUHOUN, S.; COLSON, K. E.; CONDON, J.; CONNOR, M. D.; COOPER, L. T.; CORRIERE, M.; CORTINOVIS, M.; DE VACCARO, K. C.; COUSER, W.; COWIE, B. C.; CRIQUI, M. H.; CROSS, M.; DABHADKAR, K. C.; DAHODWALA, N.; DE LEO, D.; DEGENHARDT, L.; DELOSSANTOS, A.; DENENBERG, J.; DES JARLAIS, D. C.; DHARMARATNE, S. D.; DORSEY, E. R.; DRISCOLL, T.; DUBER, H.; EBEL, B.; ERWIN, P. J.; ESPINDOLA, P.; EZZATI, M.; FEIGIN, V.; FLAXMAN, A. D.; FOROUZANFAR, M. H.; FOWKES, F. G. R.; FRANKLIN, R.; FRANSEN, M.; FREEMAN, M. K.; GABRIEL, S. E.; GAKIDOU, E.; GASPARI, F.; GILLUM, R. F.; GONZALEZ-MEDINA, D.; HALASA, Y. A.; HARING, D.; HARRISON, J. E.; HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HOEN, B.; HOTEZ, P. J.; HOY, D.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; JASRASARIA, R.; JAYARAMAN, S.; JOHNS, N.; KARTHIKEYAN, G.; KASSEBAUM, N.; KEREN, A.; KHOO, J.-P.; KNOWLTON, L. M.; KOBUSINGYE, O.; KORANTENG, A.; KRISHNAMURTHI, R.; LIPNICK, M.; LIPSHULTZ, S. E.; OHNO, S. L.; MABWEIJANO, J.; MACINTYRE, M. F.; MALLINGER, L.; MARCH, L.; MARKS, G. B.; MARKS, R.; MATSUMORI, A.; MATZOPOULOS, R.; MAYOSI, B. M.; MCANULTY, J. H.; MCDERMOTT, M. M.; MCGRATH, J.; MEMISH, Z. A.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MICHAUD, C.; MILLER, M.; MILLER, T. R.; MOCK, C.; MOCUMBI, A. O.; MOKDAD, A. A.; MORAN, A.; MULHOLLAND, K.; NAIR, M. N.; NALDI, L.; NARAYAN, K. M. V.; NASSERI, K.; NORMAN, P.; O'DONNELL, M.; OMER, S. B.; ORTBLAD, K.; OSBORNE, R.; OZGEDIZ, D.; PAHARI, B.; PANDIAN, J. D.; RIVERO, A. P.; PADILLA, R. P.; PEREZ-RUIZ, F.; PERICO, N.; PHILLIPS, D.; PIERCE, K.; POPE III, C. A.; PORRINI, E.; POURMALEK, F.; RAJU, M.;

RANGANATHAN, D.; REHM, J. T.; REIN, D. B.; REMUZZI, G.; RIVARA, F. P.; ROBERTS, T.; DE LEÓN, F. R.; ROSENFELD, L. C.; RUSHTON, L.; SACCO, R. L.; SALOMON, J. A.; SAMPSON, U.; SANMAN, E.; SCHWEBEL, D. C.; SEGUI-GOMEZ, M.; SHEPARD, D. S.; SINGH, D.; SINGLETON, J.; SLIWA, K.; SMITH, E.; STEER, A.; TAYLOR, J. A.; THOMAS, B.; TLEYJEH, I. M.; TOWBIN, J. A.; TRUELSEN, T.; UNDURRAGA, E. A.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VIJAYAKUMAR, L.; VOS, T.; WAGNER, G. R.; WANG, M.; WANG, W.; WATT, K.; WEINSTOCK, M. A.; WEINTRAUB, R.; WILKINSON, J. D.; WOOLF, A. D.; WULF, S.; YEH, P.-H.; YIP, P.; ZABETIAN, A.; ZHENG, Z.-J.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, 2012.

MERRIFIELD, M.; HOTEZ, P. J.; BEAUMIER, C. M.; GILLESPIE, P.; STRYCH, U.; HAYWARD, T.; BOTTAZZI, M. E. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2988-2991, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Neglected tropical diseases. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em 14 de jul. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em 14 de jul. 2016a.

WATTS, G. Drug development partnerships look set to grow. **The Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 16-18, 2016.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar ensaios não clínicos com o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina obtido por rota sintética que permitam analisar o seu efeito contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* Sambon.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar a 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina e caracterizá-la por meio de espectroscopia de IV, MS,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
- Determinar a toxicidade em dose única (aguda) e em doses repetidas do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina em camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) pelos seguintes parâmetros: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de ração, água, formação de urina e fezes e patologia clínica (hematologia, bioquímica).
- Determinar o potencial anti-helmíntico *in vitro* do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina sobre o *S. mansoni* pelos seguintes parâmetros: mortalidade dos vermes (ausência total de movimentos), capacidade reprodutiva (oviposição) e possíveis alterações morfológicas no tegumento dos vermes adultos.

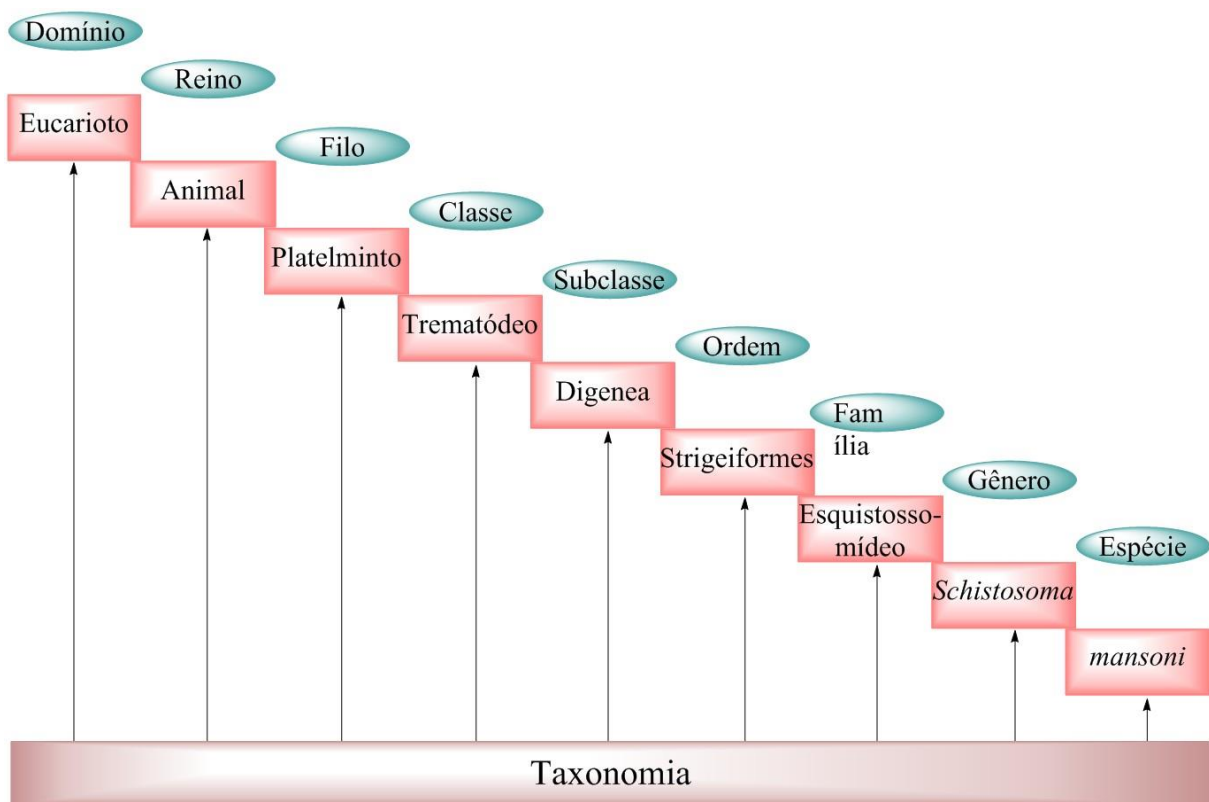
### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Esquistossomose

##### 3.1.1. *Schistosoma mansoni* Sambon

A **Figura 1** representa a classificação taxonômica da espécie *S. mansoni* (WEBSTER; LITTLEWOOD, 2012).

**Figura 1:** Taxonomia do verme *S. mansoni*.

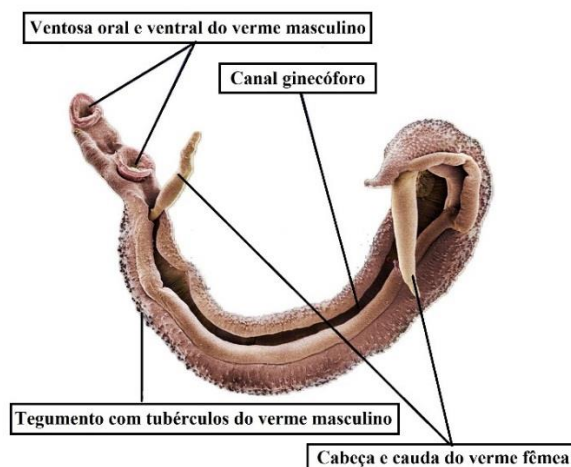


Em nível macroscópico, o verme adulto *S. mansoni* adulto (**Figura 2, p. 24**) é visível como um corpo branco/acinzentado, cilíndrico e de aproximadamente 1 cm de comprimento. É um verme digenético (provido de duas ventosas), sexuado na extremidade anterior é encontrado uma ventosa oral e a pequena distância desta, a ventosa ventral, também denominada acetábulo. O verme na forma adulta também apresenta um tegumento complexo constituído de uma membrana heptalaminar, um sistema digestivo que tem início com a ventosa oral através do esôfago e órgãos reprodutivos (GRYSEELS et al., 2006).

Vermes de *S. mansoni* usam células do sangue e globulinas como alimentos, no qual digerem em um trato intestinal cego e os detritos são regurgitados na corrente sanguínea do

hospedeiro definitivo (THÉTIOT-LAURENT et al., 2013). O metabolismo anaeróbico serve principalmente para os movimentos dos *Schistosomamachos* e produção de ovos das fêmeas(VAN OORDT et al., 1985; EL-ANSARY, 2003).

**Figura2:** Morfologia do verme *S. mansoni*.



**Fonte:** Adaptado do Museu de História Natural de Londres. Retirado em 14/07/2016 a partir de <http://www.nhm.ac.uk/our-science/science-news/2016/february/slave-trade-brought-deadly-parasite-to-caribbean.html>.

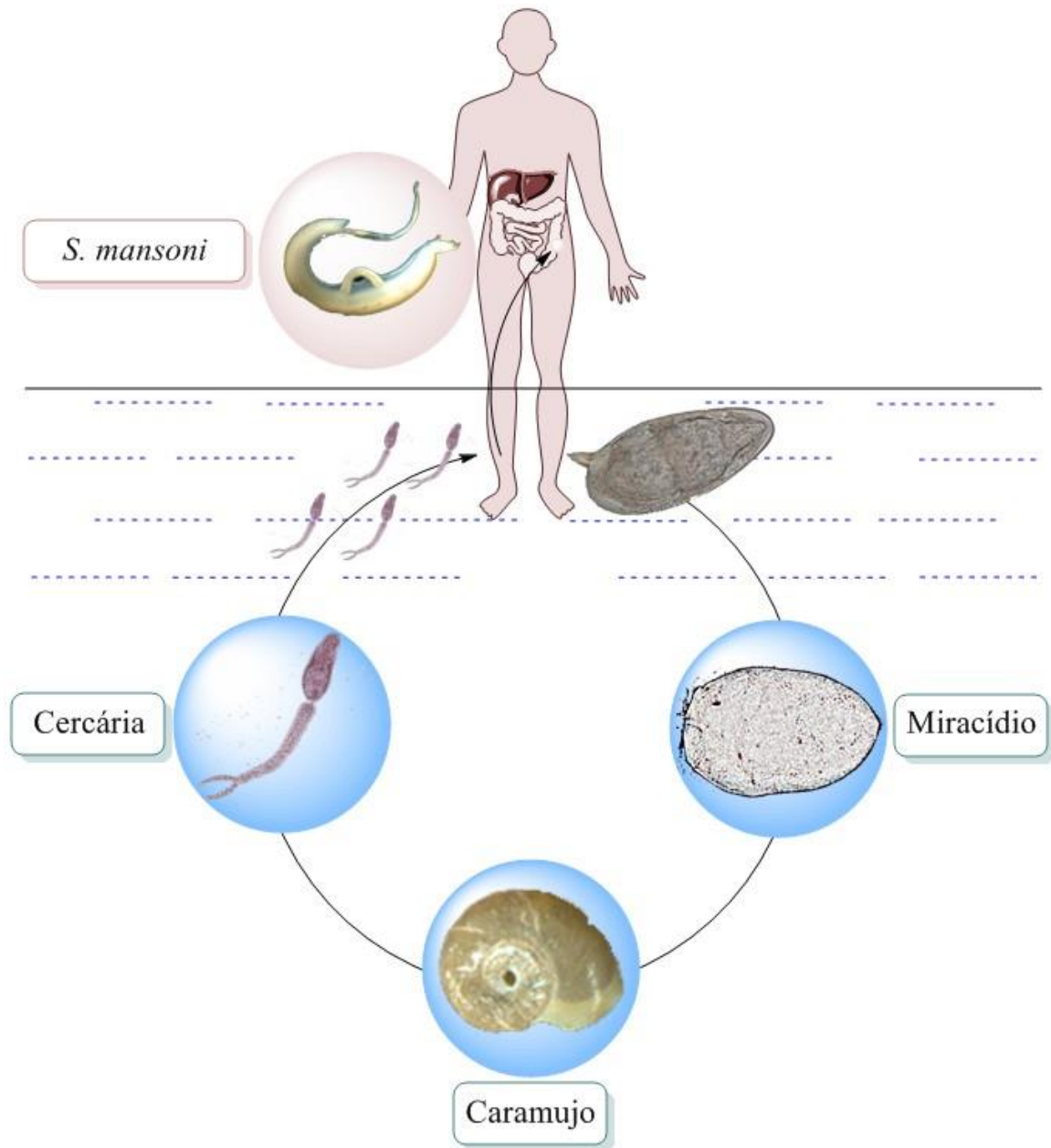
A principal etapa de infecção provocada pelo *S. mansoni* exige contato com água doce pelo o qual as formas larvais móveis emergem de hospedeiros intermediários e penetram na pele do hospedeiro definitivo como uma etapa inicial do seu ciclo e depois para um novo processo de transmissão (MCKERROW; SALTER, 2002; MITTA et al., 2012).

### 3.1.2. Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão do *S. mansoni* está resumidamente demonstrado na **Figura 3 (p. 25)**. Os vermes fêmeas produzem centenas de ovos por dia e em cada ovo é encontrado uma larva ciliada denominada de miracídio que segrega enzimas proteolíticas para facilitar os ovos migrarem dos vasos sanguíneos para o interior do lúmen intestinal (CLERINX; VAN GOMPEL, 2011; THÉTIOT-LAURENT et al., 2013). A maioria dos ovos é levada pela corrente sanguínea ou preso em tecidos, mas até um terço é excretado com a urina ou fezes. Se um ovo entra em contato com a água, os miracídios escapam e usam seus cílios para nadar ao redor em busca de um hospedeiro intermediário adequado (BUSTINDUY; KING, 2014; COLLEY et al., 2014). Os caramujos da família *Planorbidae* e do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*) são exemplos de hospedeiros intermediários (COUSTAU et al., 2015).



**Figura 3:** Ciclo de transmissão de *S. mansoni*.



**Fonte das fotos:** Museu de História Natural de Londres. Retirado em 14/07/2016 a partir de <http://www.nhm.ac.uk/nature-online/speciesoftheday/scientificadvances/schistosoma-mansoni>

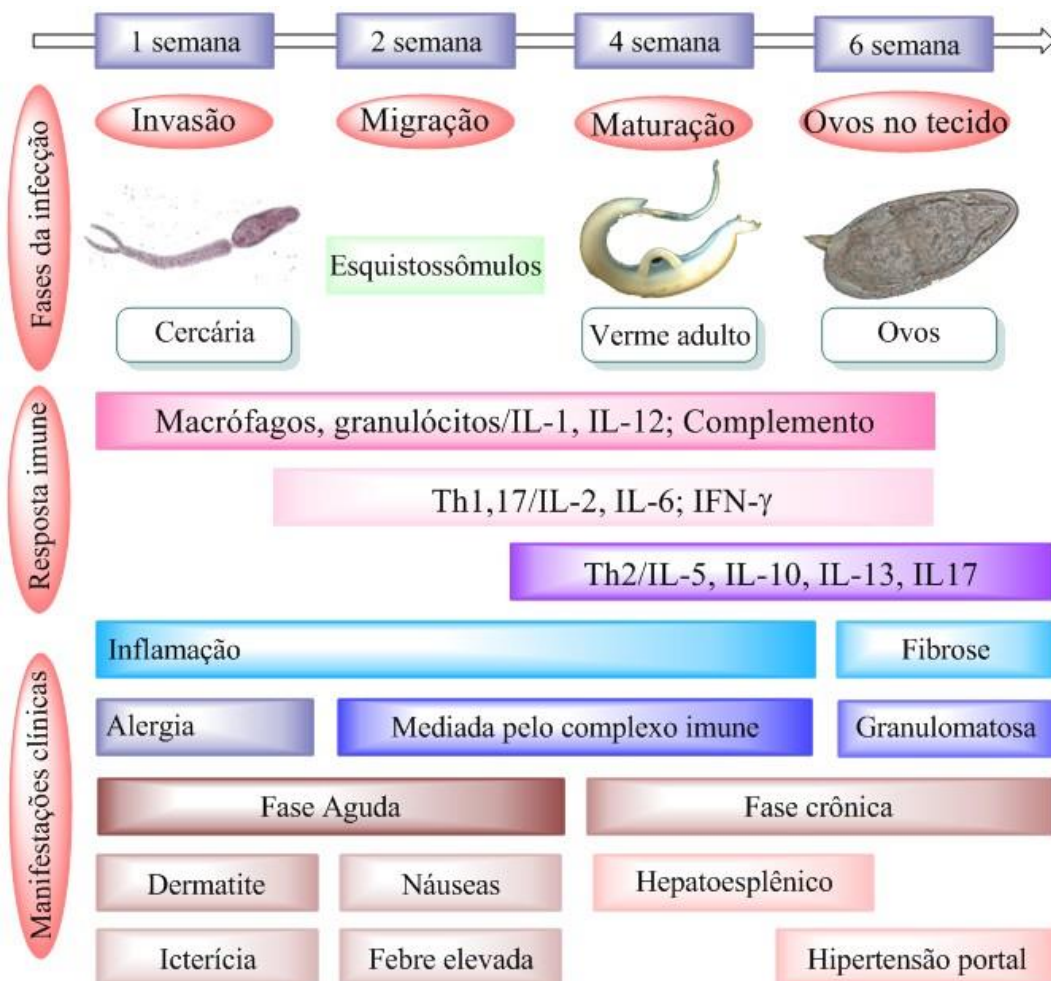
O miracídio penetra no caramujo do gênero *Biomphalaria* para o seu desenvolvimento ao longo de um período de 4 a 6 semanas em esporocistos multicelulares para sofrer várias divisões originando grande quantidade de larvas denominada cercária, na qual consiste em uma grande cabeça com características embrionárias dos *Schistosoma* adultos e uma cauda bifurcada (**Figura 3**) (BUSTINDUY; KING, 2014). Essas cercárias saem do corpo do molusco às centenas sob o estímulo da luz e podem permanecer na água por até 72 horas.

Quando há o contato com a pele humana, as cercárias penetram na derme perdendo a cauda e originando esquistossômulos, na qual, por sua vez migram pelo sangue para o coração, pulmões, fígado e veias que drenam sangue do intestino (mesentérica) (BUSTINDUY; KING, 2014; ROSE et al., 2014). Nesses órgãos, os esquistossômulos amadurecem em 4 a 6 semanas após a penetração, sendo que nas veias mesentéricas acontecem as etapas de cópula seguida pela oviposição (EL RIDI; TALLIMA, 2013). Depois dessas etapas, o ciclo é iniciado novamente dando continuidade às manifestações clínicas da esquistossomose.

### 3.1.3. Manifestações clínicas

As consequências das manifestações clínicas pelo parasita *S. mansoni* depende do tempo da infecção e podem ser classificadas principalmente como manifestações clínicas aguda e crônica (Figura 4) (ANTHONY; RAMM; MCMANUS, 2012; SAH et al., 2015).

**Figura 4:** Representação esquemática das manifestações clínicas, aguda e crônica, ocasionadas pelo parasita *S. mansoni*.



**Legenda:**IL (interleucinas), IFN-γ (interferon gama), Th (Célula T auxiliar).

### 3.1.3.1. Fase aguda da esquistossomose

Apesar da fase aguda da esquistossomose ser geralmente assintomática, manifestações clínicas após seis horas de ter ocorrido a infecção podem aparecer. As manifestações mais comuns que podem ocorrer são hipersensibilidade sistêmica caracterizada por febre, sensação de mal-estar, calafrios, fraqueza, caquexia, cefaleia, náuseas, vômitos, urticária, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia e prostração muscular (**Figura 4, p. 26**) (PAVLIN; KOZARSKY; CETRON, 2012). A fase aguda na infecção ocasionada pelo parasita *S. mansoni* ocorre principalmente em pessoas que visitaram uma região endêmica sem ter tido qualquer contato prévio com o parasita da esquistossomose (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2012; CAVALCANTI et al., 2013).

A transição da fase aguda para crônica é consequência da resposta imune do hospedeiro definitivo contra ovos retidos em tecidos intestinais e hepáticos que segregam enzimas e outros produtos tóxicos que provocam intensas respostas inflamatórias iniciando a formação de granulomas (COLLEY et al., 2014).

### 3.1.3.2. Fase crônica da esquistossomose

Durante a fase inicial da infecção (**Figura 4, p. 26**), há um tipo de célula T que inicia uma resposta auxiliar (Th1) induzida pelas fases migratórias dos vermes adultos e consequente substituição por Th2 resultante da liberação de ovos que ocorre entre 4 a 6 semanas após a infecção. Desta forma, uma reação granulomatosa envolvendo células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos é iniciada com o desenvolvimento de sintomas, tais como dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes (OLIVEIRA-PRADO et al., 2012; MENTINK-KANE; HSIEH, 2016). Com o desenvolvimento do granuloma, as fibras de colágeno e fibroblastos vão aumentando em quantidade até ocasionar a fibrose. Esta fibrose é mediada pelas interleucinas (IL-13), no qual é o principal produto da resposta Th2 (BURKE et al., 2009; ANTHONY; RAMM; MCMANUS, 2012).

Em reações inflamatórias no fígado para esquistossomose hepatoesplênica, uma característica fundamental da infecção crônica, manifestações clínicas podem ocorrer dentro de poucas semanas para infecções intensas ou em muitos anos após infecções de menor intensidade (CALDAS et al., 2008; BILGIN; TOPRAK; SEKER, 2016). A inflamação crônica produz lesões fibróticas, que por sua vez obstrui progressivamente o fluxo sanguíneo no fígado resultando na hipertensão portal, na qual pode levar ao alargamento das artérias hepáticas e as varizes esofágicas associadas podem ser rompidas seguido pela perda de sangue

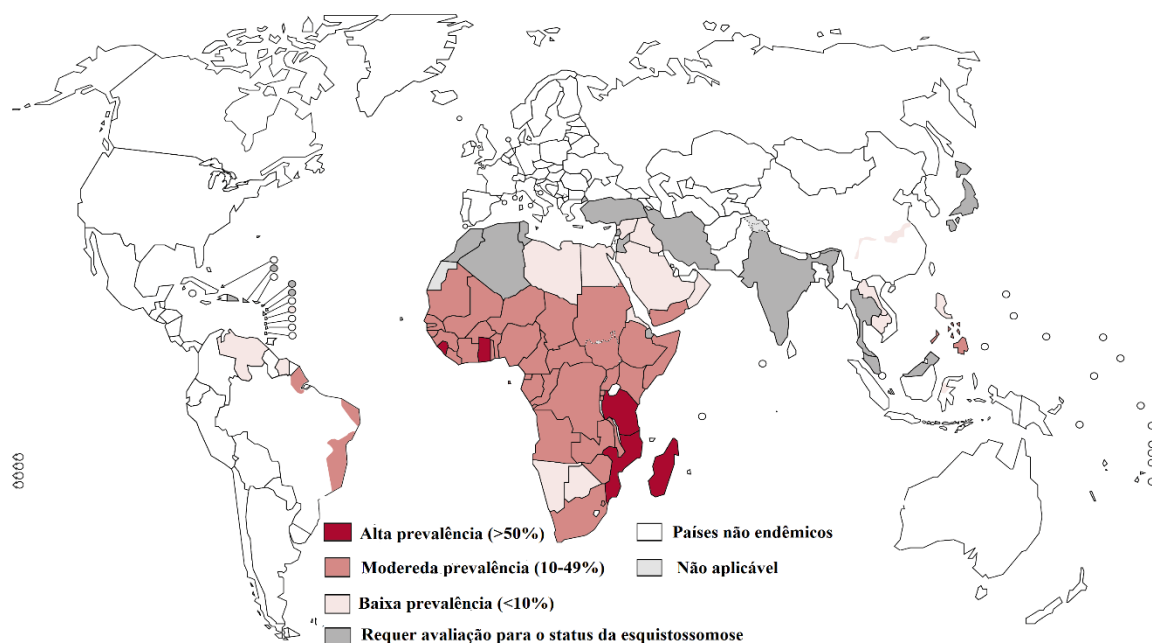
e conseqüentemente ocasionar choque hemorrágico (DIAS et al., 2013). Como já abordado, a gravidade da esquistossomose depende da intensidade e da duração da infecção, mas evidência recente sugere que a presença de infecção por si só determina a morbidade (CHAN; SHOWLER; BOGGILD, 2012).

#### **3.1.4. Esquistossomose e a necessidade de novos medicamentos**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o problema de saúde resultante da esquistossomose está estimado em 240 milhões de pessoas infectadas em 78 países, resultando na morte de aproximadamente 200 mil pessoas por ano (OMS, 2016a). Na análise dos resultados discutidos por Segundo King (2010), o número de seres humanos com esquistossomose pode ultrapassar o dobro das estimativas atuais, chegando a afetar 391 a 587 milhões de pessoas em todo o mundo.

Por estarem localizadas em áreas endêmicas, aproximadamente 700 milhões de pessoas estão em risco de desenvolver a esquistossomose e os helmintos parasitas das espécies *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* são os principais agentes causadores desta doença (EL RIDI et al., 2013; REIS et al., 2014). Dentre as espécies de parasitas do gênero *Schistosoma* abordado, o *S. mansoni* com uma ampla distribuição geográfica (África, América do Sul, Caribe e Oriente Médio) é considerado um dos principais parasitas por infectar milhões de pessoas (ROLLINSON et al., 2013).

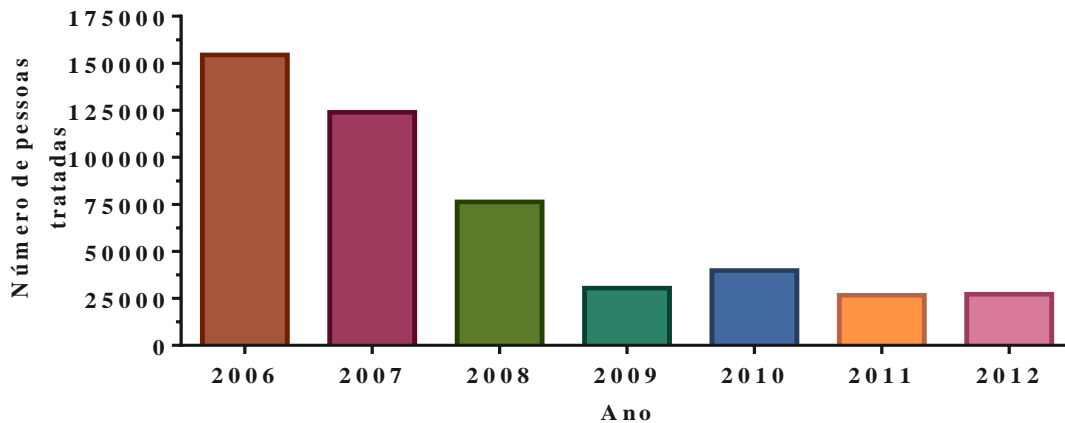
**Figura 5:** Distribuição da prevalência da esquistossomose em nível mundial. A distribuição da esquistossomose não é regular sim focal. Adicionalmente, a vigilância para esquistossomose é limitada na maioria dos países. Portanto, este mapa máscara países inteiros onde a transmissão da esquistossomose tem sido relatada.



**Fonte:** Programa de controle da esquistossomose. Dados de 2012. Organização Mundial de Saúde, Observatório Global de Saúde. Mapa retirado em 30/12/2016 a partir de [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Schistosomiasis\\_2012.png](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Schistosomiasis_2012.png).

No Brasil, é estimado entre 25 a 30 milhões o número de pessoas que estão em risco de infecção, aproximadamente 6 milhões estão infetadas e localizadas principalmente em áreas endêmicas distribuídas em 9 estados, tornando o Brasil o país mais afetado por este tipo de doença nas Américas (**Figura 5 e 7, p. 31**) (MARTINS-MELO et al., 2014; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014; SCHOLTE et al., 2014; BARBOSA et al., 2016). É importante destacar que em 2011, o Brasil teve apenas 26.677 pessoas tratadas em 22 estados, o que representa uma diminuição de 35% no número de pessoas tratadas a partir do ano de referência anterior (39.866) (OMS, 2013) (**Figura 6, p. 30**). Em 2012, foi observado um pequeno aumento de 26.677 para 27.178 (OMS, 2014), o que é considerando pequeno pela quantidade de pessoas atualmente infectadas com o parasita *S. mansoni* e que vivem em áreas endêmicas no Brasil. De acordo com os dados disponível pela OMS em 2013, 2014 e 2015, foram estimados em 1.497.865, 1.510.363 e 1.523.333, respectivamente, a população que requereu tratamento quimioterápico para tratar a esquistossomose (OMS, 2016b).

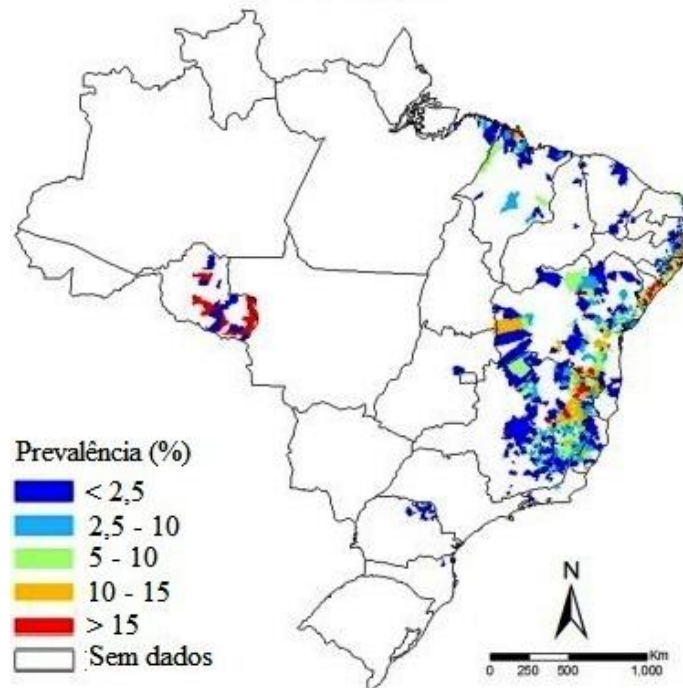
**Figura 6:** Número de pessoas tratadas no Brasil (2006-2012).



Como demonstrado na **Figura 7 (p. 31)**, as áreas com foco da esquistossomose abrangem vários estados e pode ocorrer de forma endêmica em Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. Esta doença também abrange os estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal (MARTINS-MELO et al., 2014).

Desde 1980, a Organização Mundial de Saúde recomendava várias estratégias de controle da esquistossomose em seres humanos e uma delas aborda a quimioterapia, a qual, tem sido a principal estratégia. A quimioterapia para esquistossomose humana é tomar drogas esquistossomicidas para a prevenção da morbidade na população de alto risco (quimioprofilaxia) e para o tratamento dos pacientes para eliminação de vermes adultos cujos ovos depositados nos tecidos humanos (fígado e parede intestinal) é a causa de várias manifestações clínicas da doença (**Figura 4, p. 26**). Associado ao tratamento quimioterápico, a Organização Mundial de Saúde destaca acesso à água potável, saneamento básico, educação e controle do caramujo do gênero *Biomphalaria*.

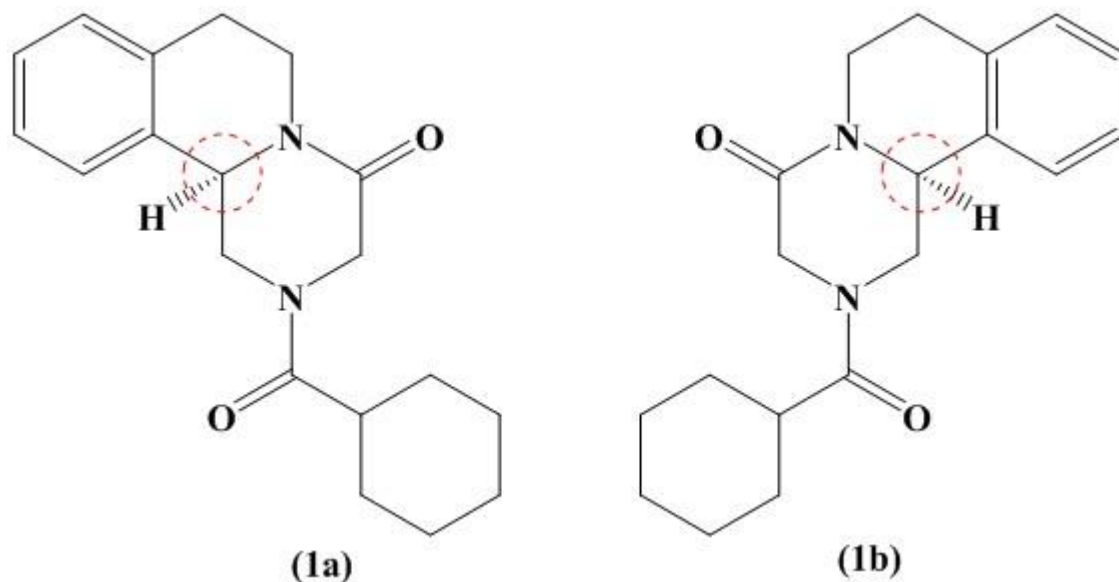
**Figura 7:** Distribuição da prevalência da esquistossomose no Brasil (2005-2009).



**Fonte:** Scholte et al. (2014).

Considerando o desenvolvimento de uma vacina humana chamada de Sm14 pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) contra o parasita causador da esquistossomose, que ainda está em estudos clínicos de Fase II, o principal tratamento quimioterápico contra algumas espécies do gênero *Schistosoma* que infectam os seres humanos (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. Mekongi*) tem sido realizado pelo uso de praziquantel (PZQ, 40 mg/kg), sendo este, um fármaco com características de baixo custo, excelente tolerabilidade, poucos efeitos colaterais e administração simples (GEARY et al., 2010; DANSO-APPIAH et al., 2013; STOTHARD et al., 2013). O PZQ (**Figura 8, p. 32**) é quimicamente denominado como (±)-2-ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona e este composto é sintetizado e comercializado como uma mistura racêmica, na qual, a espécie enantiomérica (*R*)-PZQ é a que possui efeito antiesquistossomose (WANG et al., 2014).

**Figura 8:** Estruturas químicas dos dois componentes do PZQ (mistura racêmica). A estrutura (1a) representa (*R*)-praziquantel e (1b) representa (*S*)-praziquantel. Átomo de carbono assimétrico destacado com um círculo nas duas estruturas químicas.



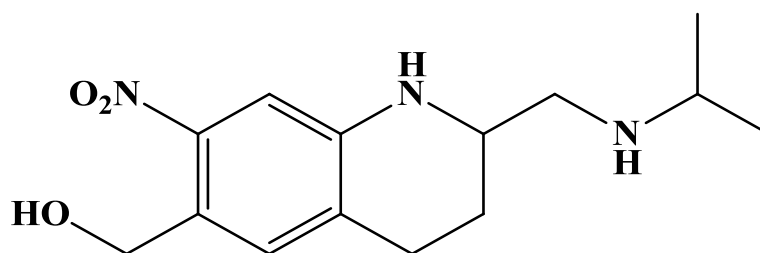
O pirazinoisoquinolina PZQ apresenta atividade apenas contra as formas adultas das espécies do gênero *Schistosoma* e apesar de ser uma droga com mais de 20 anos de uso, o seu exato alvo molecular permanecer desconhecido. Vários estudos já realizados sugerem que este composto induz alterações na manutenção da homeostase celular dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), no qual pode desencadear contrações musculares e destruição do tegumento para uma eventual morte do verme *Schistosoma* (PAX; BENNETT; FETTERER, 1978; GREENBERG, 2005; PICA-MATTOCCIA et al., 2007; PICA-MATTOCCIA et al., 2008).

Farmacocineticamente, este composto apresenta pouca estabilidade metabólica e após a administração oral sofre um rápido metabolismo de primeira passagem no fígado originando os derivados mono e dihidroxilados do PZQ (LEOPOLD et al., 1978; WESTHOFF; BLASCHKE, 1992). A eliminação do praziquantel é essencialmente renal (80% em 24 horas) e como o produto é extensivamente metabolizado, pouca quantidade do composto original é encontrado na urina (ANDREWS, 1985; DAYAN, 2003).

Além do PZQ, existe outra opção de agente quimioterapêutico que é bem menos utilizado como o composto oxamniquina (Figura 9, p. 33) (ESMAT; RAZIKY, 2009; CIOLI et al., 2014). Este composto apresenta eficácia apenas contra *S. mansoni* e o seu mecanismo de ação é desconhecido. Por causa dos efeitos adversos (crises epilêpticas e alucinações) e o custo de produção, este medicamento é pouco utilizado em programas de tratamento da esquistossomose (PIERRI; ALMEIDA; GREMIÃO, 2001; ESMAT; RAZIKY, 2009; WILBY; GILCHRIST; ENSOM, 2013).



**Figura9:** Estrutura química da oxamniquina [1,2,3,4-tetrahidro-2-(1-metiletil) aminometil-7-nitro-6-quinolinemetanol).



Desta forma, há dependência de uma única droga e em consequência do uso generalizado deste de 1980 em nível mundial, algumas espécies do gênero *Schistosoma* estão desenvolvendo tolerância e resistência contra o PZQ, o que resulta em baixas taxas de cura com consequente aumento de reinfecção (WANG; WANG; LIANG, 2012; HUYSE et al., 2013; FENWICK; JOURDAN, 2016). Desta forma, vários grupos de pesquisas têm avaliado uma série de compostos de origem natural, sintética ou semissintética para o desenvolvimento de novos agentes com potencial anti-*Schistosoma* como o acetato de carvacrolila (MORAES et al., 2013), plumbagina (LORSUWANNARAT et al., 2013), mefloquina (HOLTFRETER et al., 2011), compostos tioxi-imidazolidinas (NEVES et al., 2011), derivados de pirrolo-[1,2,5]benzotiazepinas (CHEN et al., 2013) e derivados sintéticos do PZQ (SADHU et al., 2012).

### 3.1.5. Prevalência da esquistossomose na Bahia

A Bahia é uma das 27 unidades federativas do Brasil que está dividida em 7 mesorregiões e 32 microrregiões baianas com 417 municípios. Os dados de prevalência da esquistossomose destacados na **Tabela 1**, relativo às microrregiões da Bahia para os anos de 2010 a 2013, representa o número de pessoas cujos exames foram identificados com ovos de *S. mansoni* (coproscopia) e estes dados foram obtidos do Programa de Controle da Esquistossomose da Bahia (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinan/pce/cnv/pceba.def>).

**Tabela 1:** Casos positivos de esquistossomose registrados na Bahia de 2010 a 2013.

| Microrregiões          | Anos |      |      |      | Total |
|------------------------|------|------|------|------|-------|
|                        | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |       |
| Barreiras              | 300  | 21   | 54   | 12   | 387   |
| Cotegipe               | 76   | 132  | 23   | 0    | 231   |
| Santa Maria da Vitória | 0    | 312  | 15   | 0    | 327   |
| Juazeiro               | 14   | 6    | 1    | 4    | 25    |
| Bom Jesus da Lapa      | 0    | 1    | 0    | 0    | 1     |
| Senhor Bonfim          | 725  | 427  | 223  | 23   | 1398  |
| Irecê                  | 0    | 5    | 7    | 8    | 20    |
| Jacobina               | 314  | 276  | 7    | 0    | 597   |
| Itaberaba              | 100  | 66   | 131  | 56   | 353   |
| Feira Santana          | 169  | 62   | 101  | 273  | 605   |
| Jeremoabo              | 2    | 0    | 0    | 29   | 31    |
| Euclides Cunha         | 30   | 17   | 0    | 0    | 47    |
| Ribeira Pombal         | 7    | 0    | 93   | 170  | 270   |
| Serrinha               | 153  | 129  | 42   | 0    | 324   |
| Alagoinhas             | 132  | 165  | 246  | 84   | 627   |
| Entre Rios             | 824  | 485  | 1489 | 283  | 3081  |
| Catu                   | 10   | 0    | 0    | 0    | 10    |
| Santo Antônio Jesus    | 1598 | 652  | 321  | 51   | 2622  |
| Boquira                | 6    | 0    | 0    | 0    | 6     |
| Seabra                 | 359  | 571  | 689  | 304  | 1923  |
| Jequié                 | 996  | 1115 | 280  | 64   | 2455  |
| Livramento do Brumado  | 22   | 12   | 13   | 3    | 50    |
| Guanambi               | 207  | 67   | 0    | 0    | 274   |
| Brumado                | 60   | 0    | 0    | 46   | 104   |
| Vitória da Conquista   | 352  | 224  | 75   | 2    | 653   |
| Itapetinga             | 482  | 468  | 134  | 92   | 1176  |
| Valença                | 1    | 0    | 0    | 0    | 1     |
| Ilhéus-Itabuna         | 516  | 777  | 197  | 0    | 1490  |

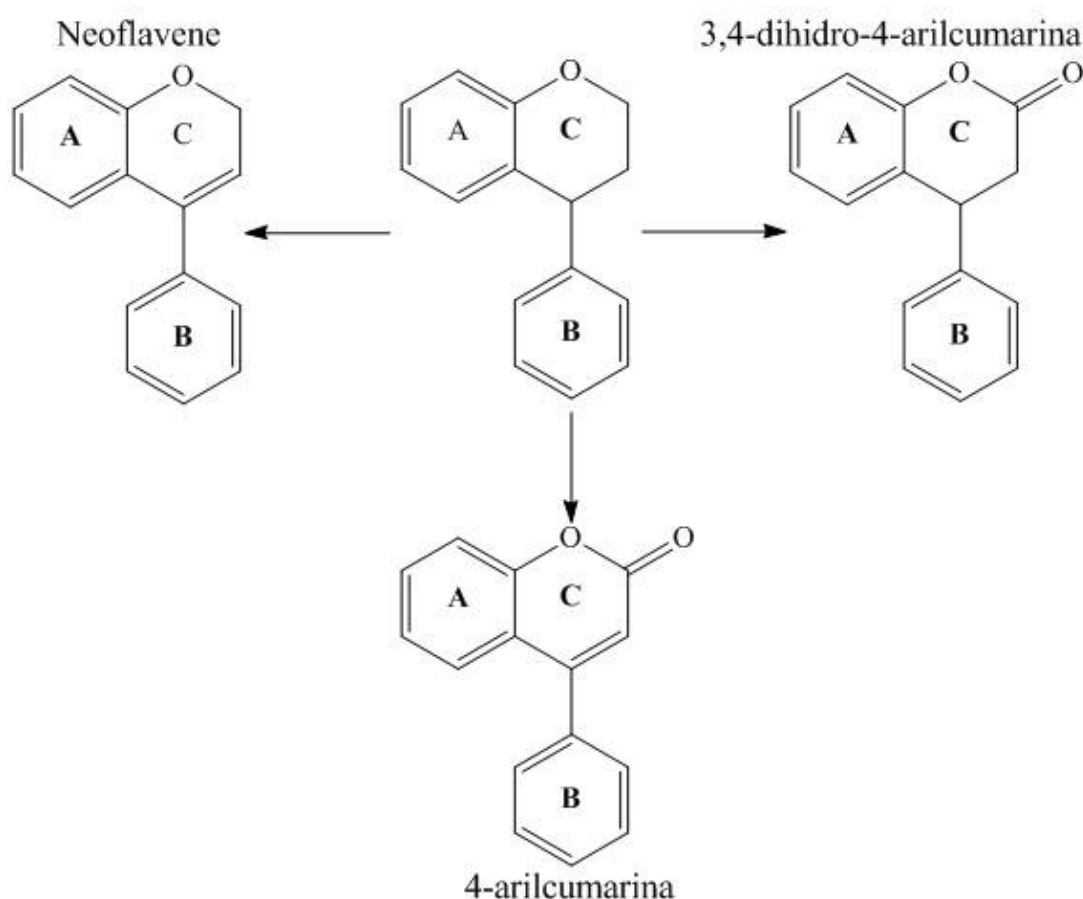
**Fonte:** MS/SVS/GT PCE.

É importante destacar que, segundo o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) (iniciado no fim da década de 70 no Brasil), estes dados históricos ainda são parciais. Na Bahia, muitos casos positivos de esquistossomose em vários municípios não são notificados e o PCE disponibiliza informações sobre esta doença na Bahia somente a partir de janeiro do ano de 1995. Dados de casos positivos para a esquistossomose a partir do ano de 2014 estão parcialmente disponíveis apenas para Senhor Bonfim, Feira Santana e Jequié.

### 3.2. Neoflavonoides

Plantas medicinais do gênero *Dalbergia*, *Hintonia*, *Mesua* e *Calophyllum* que possuem como princípios ativos neoflavonoides têm sido utilizadas na medicina tradicional (KOREC et al., 2000; KUSHWAHA et al., 2016) e vários derivados sintéticos dos neoflavonoides têm sido preparados nas últimas décadas para o estudo farmacológico de diversas doenças e distúrbios (PIERSON et al., 2010). As propriedades farmacológicas e bioquímicas dos neoflavonoides têm sido atribuídas ao padrão de substituições encontrado em sua estrutura química básica (GARAHD; GARAHD; KHILYA, 2005; GANINA et al., 2008). De acordo com a oxidação e saturação no anel C, os neoflavonoides podem ser representados pela estrutura química de 4-arilcumarina ou neoflavonona, 3,4-dihidro-4-arilcumarina e neoflavene (Figura 10) (MILLER et al., 2012; PANDEY et al., 2016).

**Figura 10:** Diferentes estruturas químicas dos neoflavonoides.



Os neoflavonoides têm sido alvo de vários estudos com relação a seu potencial terapêutico e conseqüentemente tem despertado o interesse pelo desenvolvimento de novas pesquisas que abrangem tanto ações farmacológicas como Anti-HIV (BEDOYA et al., 2005), antitumoral (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2005), anti-inflamatório (WU et al., 2011),

gastroprotetor (CRISTIANS et al., 2013), antibacteriano (VEROTTA et al., 2004), antiproliferativo (CANNING et al., 2013; LIM et al., 2016), anticâncer (LUQMAN et al., 2012) e antioxidante (CHAHAR et al., 2012), quanto reações de síntese química (KHOABI et al., 2013). Desde o primeiro experimento de síntese de neoflavonoides proposto por Kunesch e Polonsky (1967), vários protocolos têm demonstrado uma alternativa eficiente para preparação destes compostos (BOLAND et al., 1996; SHAMSUDDIN; JAMSHED, 1998; SINGH et al., 1998; PIERSON et al., 2010; YANG et al., 2015).

Além do potencial farmacológico abordado no parágrafo anterior, os neoflavonoides em estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram ser promissoras moléculas bioativas no tratamento de doenças tropicais negligenciadas como malária (KÖHLER et al., 2001), leishmaniose (BRENZAN et al., 2007) e tripanossomose americana (REYES et al., 2008). Ampliando o estudo para esta classe de compostos bioativos, estudos adicionais são necessários para dar uma maior ênfase a sua ação farmacológica em outras doenças negligenciadas como a causada por vermes do gênero *Schistosoma*.

## Referências

ANDREWS, P. Praziquantel: mechanisms of anti-*schistosomal* activity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 1, p. 129-156, 1985.

ANTHONY, B. J.; RAMM, G. A.; MCMANUS, D. P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 572-579, 2012.

BARBOSA, C. S.; DE SOUZA GOMES, E. C.; CAMPOS, J. V.; DE OLIVEIRA, F. J. M.; DA SILVA MESQUITA, M. C.; DE OLIVEIRA, E. C. A.; DOMINGUES, A. L. C. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta Tropica**, v. 164, p. 10-16, 2016.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013.

BEDOYA, L. M.; BELTRÁN, M.; SANCHO, R.; OLMEDO, D. A.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; DEL OLMO, E.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; MUÑOZ, E.; FELICIANO, A. S.; ALCAMÍ, J. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 20, p. 4447-4450, 2005.

BILGIN, S. S.; TOPRAK, H.; SEKER, M. Imaging findings of hepatosplenic schistosomiasis: a case report. **Radiology Case Reports**, In press, 2016.

BOLAND, G. M.; DONNELLY, D. M. X.; FINET, J.-P.; REA, M. D. Synthesis of neoflavones by Suzuki arylation of 4-substituted coumarins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 21, p. 2591-2597, 1996.

- BRENZAN, M.; NAKAMURA, C.; PRADO DIAS FILHO, B.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.
- BURKE, M.L.; JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; LI, Y.S.; ELLIS, M.K.; MCMANUS, D.P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.
- BUSTINDUY, A. L.; KING, C. H. Chapter 52 - Schistosomiasis. In: FARRAR, J.; HOTEZ, P.J.; JUNGHANSS, T.; KANG, G.; LALLOO, D.; WHITE, N.J. (Ed.). **Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-Third Edition)**. London: W.B. Saunders, p. 698-725, 2014.
- CALDAS, I.R.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; OLIVEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, A.M.S.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008.
- CANNING, C.; SUN, S.; JI, X.; GUPTA, S.; ZHOU, K. Antibacterial and cytotoxic activity of isoprenylated coumarin mammea A/AA isolated from *Mammea africana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 259-262, 2013.
- CAVALCANTI, M. G.; SILVA, L. F.; PERALTA, R. H. S.; BARRETO, M. G. M.; PERALTA, J. M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 75-82, 2013.
- CHAN, W. W.; SHOWLER, A.; BOGGILD, A. K. Parasitic Liver Disease in Travelers. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 755-780, 2012.
- CHAHAR, M. K.; SANJAYA KUMAR, D. S.; LOKESH, T.; MANOHARA, K. P. In-vivo antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 386-391, 2012.
- CHEN, J.; SUN, W.; YANG, J.; SUN, H.; WANG, Z.; DONG, L.; QIAO, C.; XIA, C. Development of a novel class of pyrrolo-[1,2,5]benzothiadiazepine derivatives as potential anti-schistosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 13, p. 3785-3787, 2013.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.
- CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 6-24, 2011.
- COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, *In press*, 2014.
- COUSTAU, C.; GOURBAL, B.; DUVAL, D.; YOSHINO, T. P.; ADEMA, C. M.; MITTA, G. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 5-16, 2015.

CRISTIANS, S.; BYE, R.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 530-535, 2013.

DANSO-APPIAH, A.; OLLIARO, P. L.; DONEGAN, S.; SINCLAIR, D.; UTZINGER, J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, 2013.

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 141-159, 2003.

DIAS, H.S.; DOMINGUES, A.L.C.; CORDEIRO, F.T.M.; JUCÁ, N.; LOPES, E.P. Associating portal congestive gastropathy and hepatic fibrosis in hepatosplenic mansoni schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 126, n. 3, p. 240-243, 2013.

EL-ANSARY, A. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 2, p. 227-243, 2003.

EL RIDI, R. A. F.; TALLIMA, H. A. M. Novel Therapeutic and Prevention Approaches for Schistosomiasis: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 467-478, 2013.

ESMAT, G.; RAZIKY, M. E. Antischistosomal therapy: *Current status* and recent developments. **Arab Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2009.

FENWICK, A.; JOURDAN, P. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 385-388, 2016.

GANINA, O. G.; DARAS, E.; BOURGAREL-REY, V.; PEYROT, V.; ANDRESYUK, A. N.; FINET, J.-P.; FEDOROV, A. Y.; BELETSKAYA, I. P.; COMBES, S. Synthesis and biological evaluation of polymethoxylated 4-heteroaryl coumarins as tubulin assembly inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8806-8812, 2008.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; KHILYA, V. P. Neoflavones.2. Methods for Synthesizing and Modifying 4-Arylcoumarins. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 3, p. 245-271, 2005.

GEARY, T.G.; WOO, K.; MCCARTHY, J.S.; MACKENZIE, C.D.; HORTON, J.; PRICHARD, R.K.; DE SILVA, N.R.; OLLIARO, P.L.; LAZDINS-HELDS, J.K.; ENGELS, D.A.; BUNDY, D.A. Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiasis of humans. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2010.

GREENBERG, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2005.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HOLTFRETER, M.C.; LOEBERMANN, M.; KLAMMT, S.; SOMBETZKI, M.; BODAMMER, P.; RIEBOLD, D.; KINZELBACH, R.; REISINGER, E.C. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 270-276, 2011.

HUYSE, T.; VAN DEN BROECK, F.; JOMBART, T.; WEBSTER, B.L.; DIAW, O.; VOLCKAERT, F.A.M.; BALLOUX, F.; ROLLINSON, D.; POLMAN, K. Regular treatments of praziquantel do not impact on the genetic make-up of *Schistosoma mansoni* in Northern Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 100-105, 2013.

KHOABI, M.; MOLAVERDI, F.; ALIPOUR, M.; JAFARPOUR, F.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Palladium-catalyzed domino protodecarboxylation/oxidative Heck reaction: regioselective arylation of coumarin-3-carboxylic acids. **Tetrahedron**, v. 69, n. 52, p. 11164-11168, 2013.

KING, C. H. Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 95-104, 2010.

KÖHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; GONZÁLEZ, J. C.; A, M.; HERNÁNDEZ, R.; IBARRA, W. A.; BERENDSOHN, U. G.; BIENZLE, E.; EICH. *In vitro* Antiplasmodial Activity of 4-Phenylcoumarins from *Exostemamexicanum*. **Planta Med**, v. 67, n. 01, p. 89-91, 2001.

KOREC, R.; KORECOVÁ, M.; SENSCH, K. H.; ZOUKAS, T. Antidiabetic effect of neoflavonoid coutareagenin in STZ diabetic rats and diabetic menopausal women. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 50, Supplement 1, p. 42-49 2000.

KUNESCH, G.; POLONSKY, J. On the biosynthesis of neoflavanoids: calophyllolide (4-phenylcoumarin). **Chemical Communications (London)**, v. 2, n. 7, p. 317-318, 1967.

KUSHWAHA, P.; KHEDGIKAR, V.; AHMAD, N.; KARVANDE, A.; GAUTAM, J.; KUMAR, P.; MAURYA, R.; TRIVEDI, R. A neoflavonoid dalsissoal isolated from heartwood of *Dalbergia sissoo* Roxb. has bone forming effects in mice model for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 65-74, 2016.

LEOPOLD, G.; UNGETHÜM, W.; GROLL, E.; DIEKMANN, H. W.; NOWAK, H.; WEGNER, D. H. G. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 281-291, 1978.

LIM, C. K.; HEMAROOPINI, S.; GAN, S. Y.; LOO, S. M.; LOW, J. R.; JONG, V. Y. M.; SOO, H. C.; LEONG, C. O.; MAI, C. W.; CHEE, C. F. *In vitro* cytotoxic activity of isolated compounds from Malaysian Calophyllum species. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 8, p. 1686-1694, 2016.

LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; OLMEDO, D. A.; DEL OLMO, E.; VÁSQUEZ, Y.; SOLÍS, P. N.; GUPTA, M. P.; SAN FELICIANO, A. Cytotoxic 4-Phenylcoumarins from the Leaves of *Marila pluricostata*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 369-373, 2005.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTA, P.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 18-27, 2013.

LUQMAN, S.; MEENA, A.; SINGH, P.; KONDRATYUK, T. P.; MARLER, L. E.; PEZZUTO, J. M.; NEGI, A. S. Neoflavonoids and Tetrahydroquinolones as Possible Cancer Chemopreventive Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, n. 4, p. 616-624, 2012.

MARTINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C. C.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; BEZERRA, F. S. D. M.; HEUKELBACH, J. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000–2011. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1055-1062, 2014.

MCKERROW, J.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 193-195, 2002.

MENTINK-KANE, M. M.; HSIEH, M. H. Immunology of Schistosomiasis A2 - Ratcliffe, Michael J.H. In: (Ed.). **Encyclopedia of Immunobiology**. Oxford: Academic Press, 2016. p.150-158.

MILLER, B. J.; PIETERSE, T.; MARAIS, C.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B. Ring-closing metathesis as a new methodology for the synthesis of monomeric flavonoids and neoflavonoids. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 35, p. 4708-4710, 2012.

MITTA, G.; ADEMA, C. M.; GOURBAL, B.; LOKER, E. S.; THERON, A. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2012.

MORAES, J.D.; CARVALHO, A.L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.; MARQUES, T.D.; ANDRADE, L.; FREITAS, R.; SOUSA, D. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

NEVES, J.K.A.L.; DE LIMA, M.D.C.A.; PEREIRA, V.R.A.; DE MELO, C.M.L.; PEIXOTO, C.A.; PITTA, I.D.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; GALDINO, S.L. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 82-90, 2011.

OLIVEIRA-PRADO, R.; CALDAS, I.R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.V.; FARES, R.C.G.; PORTUGAL, L.M.; GAZZINELLI, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CUNHA-MELO, J.R. Cytokine profile, proliferation and phosphorylation of ERK1/2 and Akt in circulating mononuclear cells from individuals during the chronic intestinal phase of *Schistosomiasis mansoni* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 380, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/NTD\\_RoadMap\\_2012\\_Fullversion.pdf?ua](http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf?ua)>. Acesso em 18 de jun. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em 30 de dezembro. 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis: number of people treated in 2011. **Weekly Epidemiological Record**, v. 88, n. 8, p. 81–88, 2013b.



ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis: number of people receiving preventive chemotherapy in 2012. **Weekly Epidemiological Record**, v. 89, n. 2, p. 21–28, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). PCT databank Schistosomiasis. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/sch/db/?units=minimal&region=all&country=bra&countries=bra&year=2015](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/?units=minimal&region=all&country=bra&countries=bra&year=2015)>. Acesso em 30 de dezembro. 2016c.

PANDEY, R. P.; PARAJULI, P.; KOFFAS, M. A. G.; SOHNG, J. K. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 634-662, 2016.

PAVLIN, B. I.; KOZARSKY, P.; CETRON, M. S. Acute pulmonary schistosomiasis in travelers: Case report and review of the literature. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 10, n. 5–6, p. 209-219, 2012.

PAX, R.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 304, n. 3, p. 309-315, 1978.

PICA-MATTOCCIA, L.; VALLE, C.; BASSO, A.; TROIANI, A. R.; VIGOROSI, F.; LIBERTI, P.; FESTUCCI, A.; CIOLI, D. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 344-351, 2007.

PICA-MATTOCCIA, L.; ORSINI, T.; BASSO, A.; FESTUCCI, A.; LIBERTI, P.; GUIDI, A.; MARCATTO-MAGGI, A.L.; NOBRE-SANTANA, S.; TROIANI, A.-R.; CIOLI, D.; VALLE, C. *Schistosoma mansoni*: Lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 332-335, 2008.

PIERSON, J.T.; DUMÈTRE, A.; HUTTER, S.; DELMAS, F.; LAGET, M.; FINET, J.-P.; AZAS, N.; COMBES, S. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 864-869, 2010.

PIERRI, E. G.; ALMEIDA, A. E.; GREMIÃO, M. P. D. Determination of oxamniquine in capsules by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 4, p. 675-679, 2001.

REIS, E.V.; PEREIRA, R.V.; GOMES, M.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; BABA, E.H.; COELHO, P.M.Z.; MATTOS, A.C.A.; COUTO, F.F.B.; CASTRO-BORGES, W.; GUERRA-SÁ, R. Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 120-126, 2014.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; VEGA-AVILA, E.; ABE, F.; KINJO, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mamea-type coumarins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 431-436, 2008.

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J.R.; TCHUEM TCHUENTÉ, L.A.; GARBA, A.; MOHAMMED, K.A.; SCHUR, N.; PERSON, B.; COLLEY, D.G.; UTZINGER, J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013.

ROSE, M. F.; ZIMMERMAN, E. E.; HSU, L.; GOLBY, A. J.; SALEH, E.; FOLKERTH, R. D.; SANTAGATA, S. S.; MILNER JR, D. A.; RAMKISSOON, S. H. Atypical presentation of cerebral schistosomiasis four years after exposure to *Schistosoma mansoni*. **Epilepsy & Behavior Case Reports**, v. 2, n. 1, p. 80-85, 2014.

SADHU, P.S.; KUMAR, S.N.; CHANDRASEKHARAM, M.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; RAO, V.J. Synthesis of new praziquantel analogues: Potential candidates for the treatment of schistosomiasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 1103-1106, 2012.

SAH, V. K.; WANG, L.; MIN, X.; RIZAL, R.; FENG, Z.; KE, Z.; DENG, M.; LI, L.; LI, H. Human schistosomiasis: A diagnostic imaging focused review of a neglected disease. **Radiology of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 150-157, 2015.

SCHOLTE, R.G.C.; GOSONI, L.; MALONE, J.B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57-63, 2014.

SHAMSUDDIN, K.; JAMSHED AHMED SIDDIQUI, M. One-pot Synthesis of 4-Phenylcoumarins. **Journal of Chemical Research, Synopses**, n. 7, p. 392-393, 1998.

SINGH, J.; KAUR, J.; NAYYAR, S.; L. KAD, G. Highly Efficient and Single Step Synthesis of 4-Phenylcoumarins and 3,4-Dihydro-4-phenylcoumarins Over Montmorillonite K-10 Clay, Under Microwave Irradiation[dagger]. **Journal of Chemical Research, Synopses**, n. 5, p. 280-281, 1998.

STOTHARD, J. R.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; BETSON, M.; BUSTINDUY, A.; REINHARD-RUPP, J. Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 197-205, 2013.

THÉTIOT-LAURENT, S.A.L.; BOISSIER, J.; ROBERT, A.; MEUNIER, B. Schistosomiasis Chemotherapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 31, p. 7936-7956, 2013.

VAN OORDT, B. E. P.; VAN DEN HEUVEL, J. M.; TIELENS, A. G. M.; VAN DEN BERGH, S. G. The energy production of the adult *Schistosoma mansoni* is for a large part aerobic. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 117-126, 1985.

VEROTTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, P. V.; NERI, M. G.; RAIMONDI, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2867-2879, 2004.

WANG, H.; FANG, Z.-Z.; ZHENG, Y.; ZHOU, K.; HU, C.; KRAUSZ, K. W.; SUN, D.; IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. Metabolic profiling of praziquantel enantiomers. **Biochemical Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 166-178, 2014.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y.S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, 2012.

WEBSTER, B. L.; LITTLEWOOD, D. T. J. Mitochondrial gene order change in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatidae). **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 3, p. 313-321, 2012.

WESTHOFF, F.; BLASCHKE, G. High-performance liquid chromatographic determination of the stereoselective biotransformation of the chiral drug praziquantel. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 578, n. 2, p. 265-271, 1992.

WILBY, K.; GILCHRIST, S.; ENSOM, M. H. A Review of the Pharmacokinetic Implications of Schistosomiasis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 52, n. 8, p. 647-656, 2013.

WU, S.-F.; CHANG, F.-R.; WANG, S.-Y.; HWANG, T.-L.; LEE, C.-L.; CHEN, S.-L.; WU, C.-C.; WU, Y.-C. Anti-inflammatory and Cytotoxic Neoflavonoids and Benzofurans from *Pterocarpussantalinus*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 989-996, 2011.

YANG, Y.; HAN, J.; WU, X.; XU, S.; WANG, L. Synthesis of 4-arylcoumarins via palladium-catalyzed arylation/cyclization of ortho-hydroxycinnamates with diaryliodonium salts. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 24, p. 3809-3812, 2015.

Neoflavonoides como prospectivos compostos para o tratamento  
de doenças tropicais negligenciadas e HIV

## **4. CAPÍTULO I**

(Capítulo publicado na *Current Bioactive Compounds*)

Qualis B3

## Neoflavonoides como compostos prospectivos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas e HIV

### Resumo

O termo neoflavonoide compreende um grupo de compostos que possui um esqueleto de carbono C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e que ocorre naturalmente em plantas superiores das famílias Clusiaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Passifloraceae, Asteraceae e Rutaceae. Os neoflavonoides têm atraído grande interesse nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas e bioquímicas apresentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, a qual é atribuída aos padrões de substituições encontradas em sua estrutura química básica. Dentre outras atividades farmacológicas, esses compostos têm se destacado em estudos *in vitro* e *in vivo* como moléculas bioativas promissoras no tratamento de algumas doenças tropicais negligenciadas (DTNs), tais como malária, leishimaniose e tripanossomose americana (Doenças de Chagas). Os neoflavonoides (Inofilum B, Inofilum P) ainda têm se destacado como moléculas bioativas contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), no qual, é usado para o desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da SIDE(Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Logo, uma investigação mais intensa dos neoflavonoides pode propiciar a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas bioativase por isso, esta revisão sumariza os resultados de estudos envolvendo neoflavonoides e seus derivados com implicações terapêuticas no tratamento das DTNs e HIV.

**Palavras chaves:**Doenças tropicais negligenciadas; Moléculas bioativas;Neoflavonoides; Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

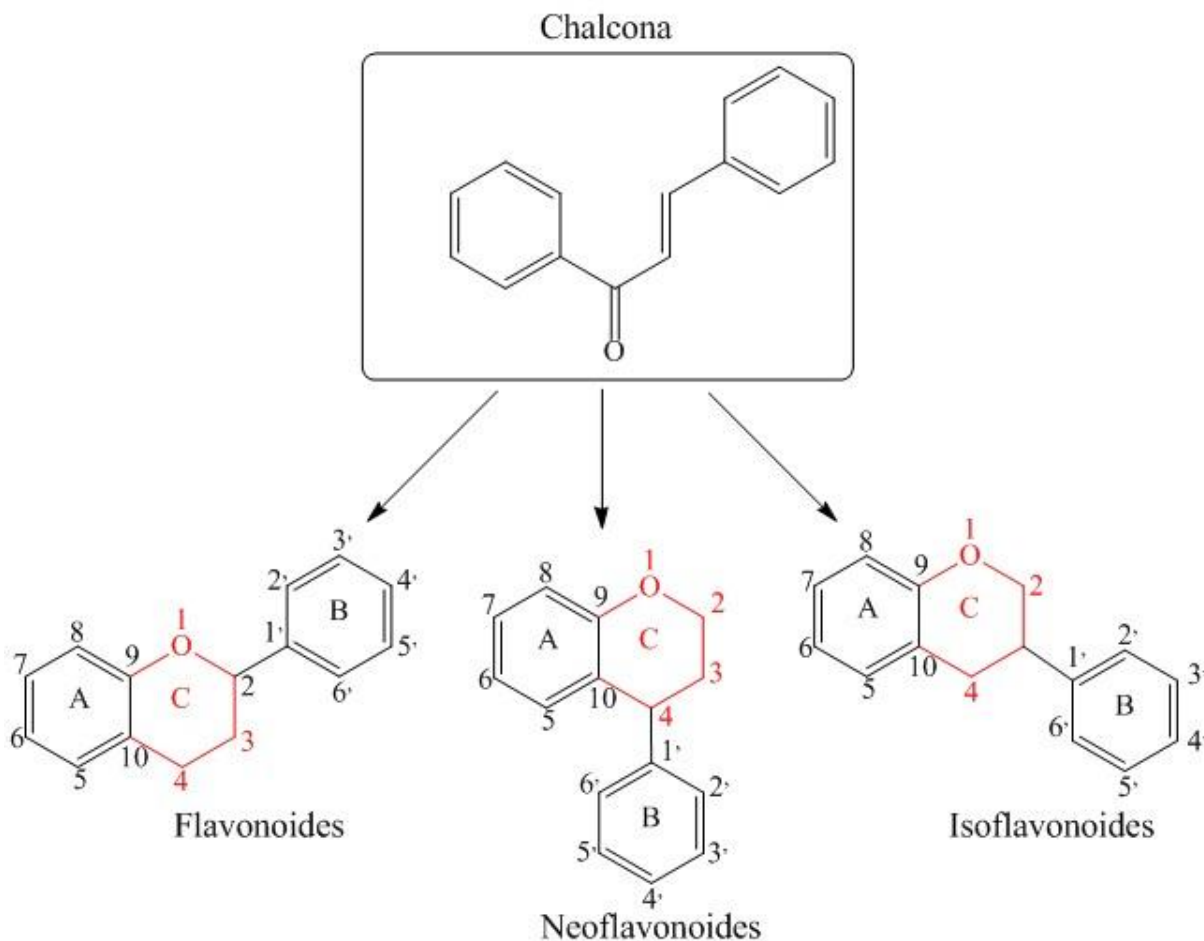
## 1. Introdução

### 1.1. Neoflavonoides

Os compostos fenólicos compreendem uma grande classe de substâncias que têm sido classificadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos:  $C_6$  (fenóis simples),  $C_6-C_1$  (ácidos fenólicos),  $C_6-C_2$  (acetofenonas, ácidos fenilacéticos),  $C_6C_3$  (ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides e cumarinas),  $C_6-C_4$  (naftoquinonas),  $C_6-C_1-C_6$  (xantonas),  $C_6-C_2-C_6$  (estilbenos e antraquinonas),  $C_6-C_3-C_6$  (flavonoides, isoflavonas e neoflavonoides),  $C_6-C_3-C_6)_2$  (biflavonoides),  $(C_6-C_3)_2$  (lignanas e neolignanas),  $(C_6-C_3)_n$  (lignina) e  $(C_6-C_3-C_6)_n$  (taninos condensados) (CHEYNIER et al., 2013).

Dentre as classes de substâncias que se destacam entre os compostos fenólicos, os flavonoides formam um grande grupo de produtos naturais com mais de 10000 estruturas distintas já identificadas (AGATI et al., 2012; PANDEY et al., 2016). Como descrito no parágrafo anterior, as estruturas químicas dos flavonoides possuem um esqueleto  $C_6-C_3-C_6$  que são constituídos por um anel fenil (anel B) ligado a uma porção benzopirano (anel C), que por sua vez é ligado a um anel aromático (anel A) (**Figura 1, p. 47**) (VELIŠEK; DAVÍDEK; CEJPEK, 2008; DE VILLIERS; VENTER; PASCH, 2016). Dependendo da posição de ligação do anel fenil ao carbono da porção benzopirano, além dos flavonoides (2-fenilbenzopirano), mais dois tipos de compostos naturais podem ser formados, os isoflavonoides (3-fenilbenzopirano) e os neoflavonoides (4-fenilbenzofurano) (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005; SELEPE et al., 2013). Os neoflavonoides estão relacionados estruturalmente e bioergeticamente aos flavonoides e isoflavonoides, na qual, essas três classes de compostos compartilham a chalcona como um precursor em comum (DONNELLY; SHERIDAN, 1988). As estruturas básicas dessas três classes de compostos estão representadas na **Figura 1 (p. 47)**.

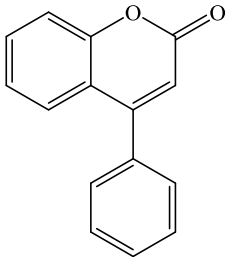
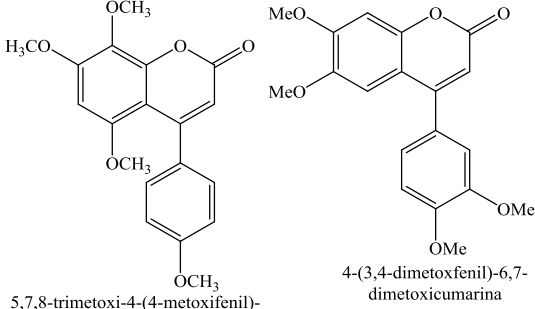
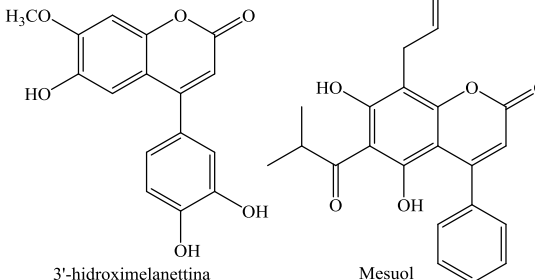
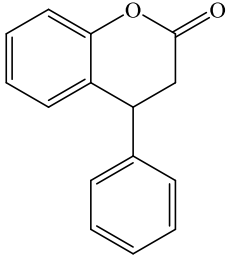
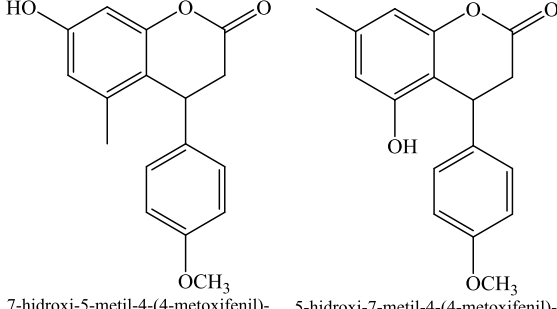
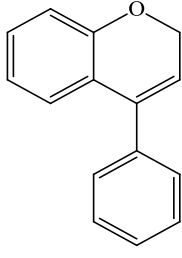
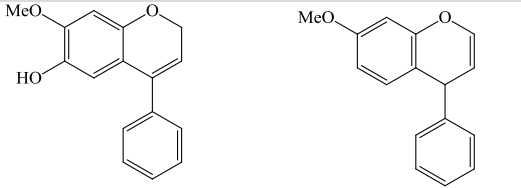
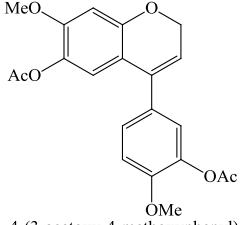
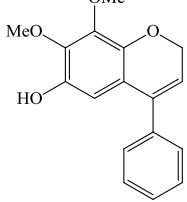
**Figura 1:** Estrutura química básica dos flavonoides, isoflavonoides e neoflavonoides. As estruturas químicas desta classe de compostos são baseadas em um esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e da saturação do anel C (vermelho).



Dentre os três grupos de compostos representados na **Figura 1**, os neoflavonoides estão entre os compostos menos estudados e por isso é foco do presente trabalho. O termo neoflavonoide foi designado por Eyton et al. (1965a) para descrever inicialmente um grupo de compostos que estavam sendo isolados a partir de extratos de plantas e que eram denominados 4-arilcumarinas (4-fenilcumarinas) e dalbergionas (neoflavonoides acíclicos) (RAO; SESHADRI, 1963; EYTON et al., 1965b). Os neoflavonoides e seus derivados são representados principalmente pelo esqueleto das estruturas químicas de 4-arilcumarina (neoflavona), 3,4-dihidro-4-arilcumarina e neoflavene (**Tabela 1, p. 48**), sendo neoflavene o menos representativo (GROTEWOLD, 2006; MILLER et al., 2012; PANDEY et al., 2016).

Os neoflavonoides possuem baixo peso molecular e estão presentes em uma grande variedade de plantas superiores das famílias Clusiaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Passifloraceae, Asteraceae e Rutaceae, sendo que até o presente momento, mais de 1000 neoflavonoides estruturalmente distintos têm sido descritos (FINEFIELD et al., 2012).

**Tabela 1:** Estrutura química básica do 4-arilcumarina,3,4-dihidro-4-arilcumarina e neoflavene.

| Neoflavonoide                     | Estrutura química geral   | Exemplos   |
|-----------------------------------|---|--|
| <b>4-arilcumarina</b>             |    |  <p>5,7,8-trimetoxi-4-(4-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona</p> <p>4-(3,4-dimetoxifenil)-6,7-dimetoxicumarina</p>  <p>3'-hidroximelanettina</p> <p>Mesuol</p>   |
| <b>3,4-dihidro-4-arilcumarina</b> |  |  <p>7-hidroxi-5-metil-4-(4-metoxifenil)-3,4-di-idrocumarina</p> <p>5-hidroxi-7-metil-4-(4-metoxifenil)-3,4-di-idrocumarina</p>   |
| <b>Neoflavene</b>                 |  |  <p>7-metoxi-4-fenil-2H-cromen-6-ol</p> <p>4-fenil-4H-7-metoxicromene</p>  <p>4-(3-acetoxi-4-metoxifenil)-7-metoxicromen-6-yl acetate</p>  <p>7,8-dimetoxi-4-fenil-2H-cromen-6-ol</p> |



Os neoflavonoides têm atraído grande interesse nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas e bioquímicas apresentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, na qual, é atribuída ao padrão de substituições encontrado em sua estrutura química básica (**Tabela 1**) (DONNELLY et al., 1988; GARAZD; GARAZD; KHILYA, 2003;GANINA et al., 2008).Os neoflavonoides podem sofrer grandes modificações químicas fazendo ainda dessa classe de composto extremamente atraente para síntese orgânica (MOSKVINA et al., 2009;KHOABI et al., 2013).

Desta forma, os neoflavonoides têm sido cada vez mais isolados, caracterizados e sintetizados e suas implicações terapêuticas no tratamento de doenças tropicais negligenciadas têm sido avaliadas com a obtenção de promissores resultados.No presente trabalho, serão abordados os resultados dos estudos envolvendo neoflavonoides com potencial terapêutico no tratamento das doenças tropicais negligencias e HIV.

## **1.2. Doenças tropicais negligenciadas**

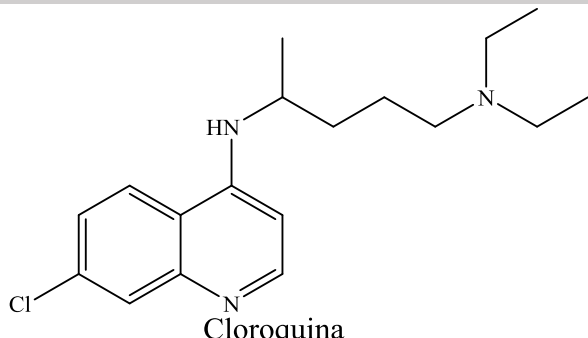
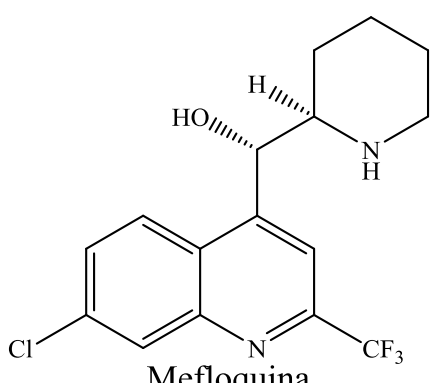
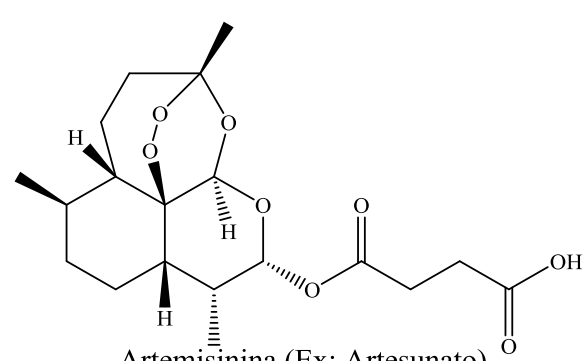
As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) abrange um grupo de doenças causadas por uma variedade de patógenos que afetam principalmente as populações de baixa renda de regiões da África, Ásia e América Latina (CONTEH et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 17 doenças atualmente são reconhecidas oficialmente como DTNs, sendo que destas 17 doenças, quatro são causadas por bactérias patogênicas (Úlcera de Bauru, hanseníase, tracoma e “Bouba”), três são causadas por protozoários (Doença de Chagas, Tripanossomíase humana Africano e Leishmaniose), 2 são virais (Dengue e Raiva) e os outros oito são causadas por várias espécies de vermes parasitas.

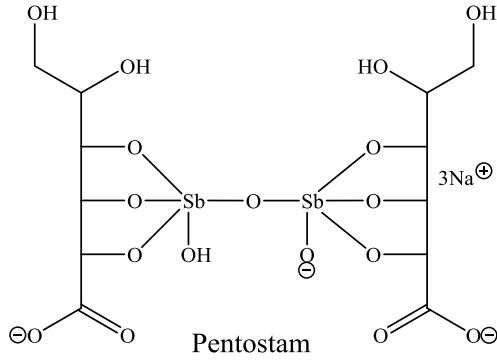
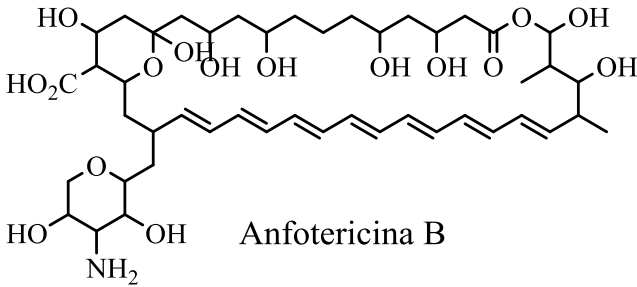
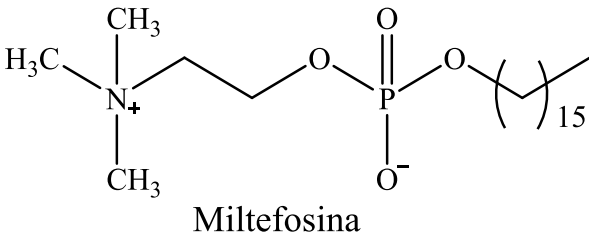
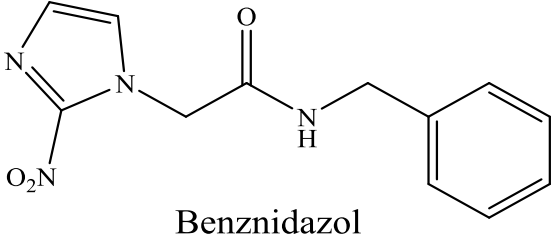
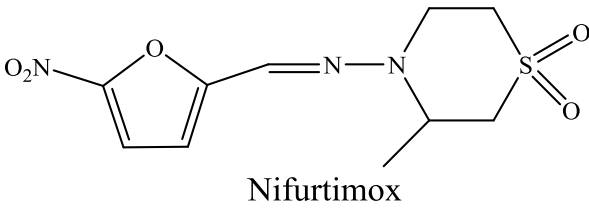
As DTNsafetammaisde 1 bilhões de pessoas em todo o mundo e são responsáveis pela morte de milhões de pessoas anualmente(OMS, 2016a). Além disso, as DTNs podem induzir sequelas como anemia (ancilostomíase), cegueira (tracoma), desnutrição (helmintíase transmitida pelo solo), retardo do desenvolvimento físico e mental, complicações neurológicas e danos a vários órgãos internos do corpo humano (esquistossomose, filariose linfática e lepra) (JANNIN et al., 2013). Todos esses problemas envolvendo as DTNs estão diretamente relacionados à extrema pobreza, falta de saneamento básico e serviços de saúde com tratamentos adequados (YAJIMA et al., 2012).

Mesmo reconhecendo que as DTNs ameaçam a saúde de bilhões de seres humanos, a atual situação é ainda agravada pelo fato de que a maioria das pessoas afetadas ou ameaçadas pelas DTNs tem um perfil de baixa renda e essa situação faz com que as indústrias farmacêuticas não invistam no desenvolvimento de novos medicamentos, já que o valor

demercado dos medicamentos é baixo e porque os afetados não podem pagar pelos medicamentos (OLIVEIRA et al., 2015). É importante abordar que alguns medicamentos disponíveis para o tratamento das DTNs são antigos (datam de sua descoberta) e que apresentam cada vez mais limitações (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Exemplos de medicamentos utilizados contra algumas DTNs e suas limitações.

| Medicamentos disponíveis para o tratamento de algumas DTNs   | Limitações             | Ano do Medicamento |
|--|------------------------|--------------------|
| <p><b>Malária</b></p>  <p>Cloroquina</p> | Resistência            | 1945               |
|  <p>Mefloquina</p>                      | Resistência, segurança | 1970               |
|  <p>Artemisinina (Ex: Artesunato)</p>   | Custo, segurança       | 1980               |
| <b>Leishmaniose</b>  |                        |                    |

|   |   |      |
|---|---|------|
|  <p>Pentostam</p>      | Resistência,<br>Segurança, eficácia                       | 1939 |
|  <p>Anfotericina B</p> | Custo, injetável  | 1959 |
|  <p>Miltefosina</p>   | Resistência   | 1987 |
| <b>Doença de Chagas</b>   |   |      |
|  <p>Benznidazol</p>  | Segurança e pouco<br>efetivo na fase<br>crônica da doença | 1970 |
|  <p>Nifurtimox</p>   | Segurança e<br>tratamento longo                           | 1970 |

Assim, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos medicamentos e os produtos naturais derivados das plantas representam uma grande oportunidade para a descoberta de novas moléculas com potencial interesse terapêutico para o tratamento das DTNs (SCHMIDT et al., 2012; ZOFOU et al., 2013).

## 2. Método de pesquisa e critérios de seleção

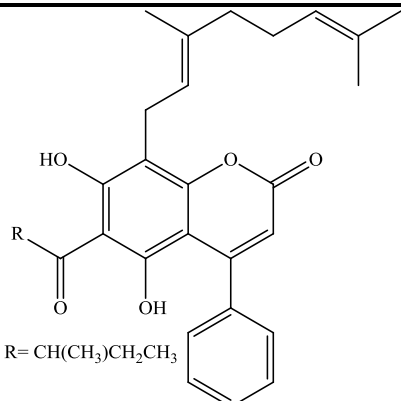
O presente estudo de revisão sistemático foi elaborado com base em uma pesquisa bibliográfica abrangente utilizando as bases de dados científicos *ScienceDirect*, *Scopus*, *Pub Med*, *Web of Science* e *SciFinder*. A pesquisa foi realizada até julho de 2016 utilizando os seguintes termos de pesquisa: neoflavonoides, doenças tropicais negligenciadas, 4-fenilcumarina, 4-arilcumarinas, neoflavonas, leishmaniose, Oncocercose, Ascariíase, Ancilostomose, doença de Chagas, tripanossomíase, malária, esquistossomose e dengue. Essas palavras também foram agrupadas em várias combinações, sendo considerados válidos os artigos de pesquisa original (revisões, meta-análises, ensaios clínicos e relatos de casos) de texto completo e que apresentassem os termos de pesquisa no título e/ou resumo. Artigos em língua inglesa, espanhol e português publicados até a presente data foram incluídos na elaboração do presente artigo. O uso deste procedimento metodológico teve como base o artigo de Oliveira e Freitas(2015).

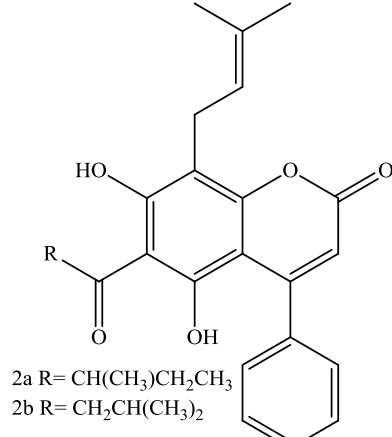
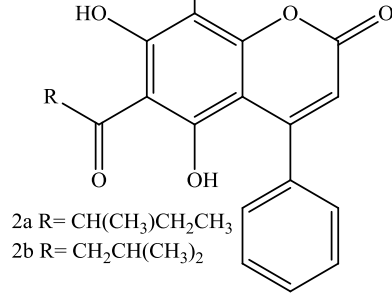
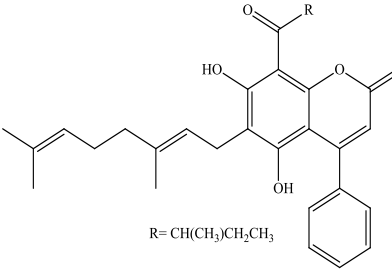
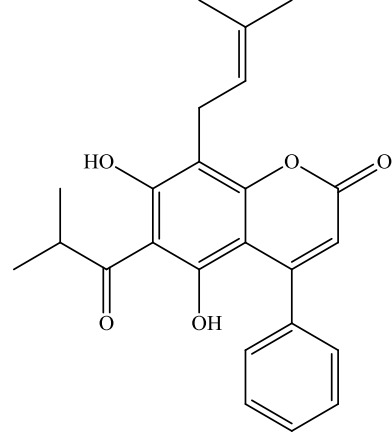
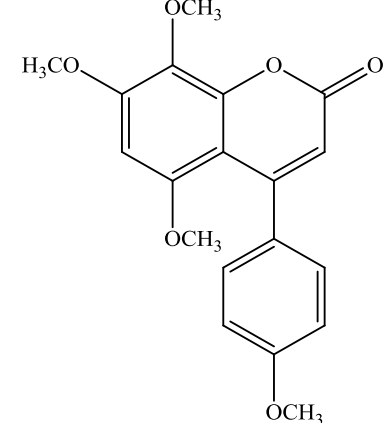
## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Descrição dos resultados

O resultado da pesquisa bibliográfica obtido no presente estudo resultou na elaboração de uma lista dos neoflavonoides isolados e seus derivados com implicações no tratamento das DTNs (malária, leishmaniose e tripanossomíase americana) e HIV. A lista está demonstrada na **Tabela 3**.

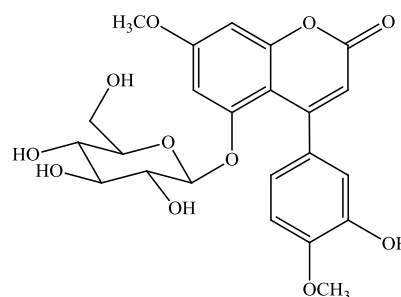
**Tabela 3:** Nome, fórmula molecular e estrutura química dos neoflavonoides abordados no presente trabalho.

| Neoflavonoides  | Formula molecular | Estrutura química   | Referência            |
|---|-------------------|---|-----------------------|
| <p><b>(1)</b><br/>5,7-dihidroxi-6-(2-metilbutanoil) -8-[(E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil] -4-fenil-2H-cromen-2-ona</p> | $C_{30}H_{34}O_5$ |  <p>R= CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p> | Verotta et al. (2004) |

|   |                   |   |  |
|---|-------------------|---|--|
| <p><b>(2a)</b><br/>5,7-dihidroxi-6-(2-metilbutanoil)-8-(3-metilbut-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona</p>              | $C_{25}H_{26}O_5$ |   | <p>Verotta et al. (2004)</p>                         |
| <p><b>(2b)</b><br/>5,7-dihidroxi-6-(3-metilbutanoil)-8-(3-metilbut-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona</p>              | $C_{25}H_{26}O_5$ |  <p>2a R= CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><br/>2b R= CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></p> |  |
| <p><b>(3)</b><br/>5,7-dihidroxi -8-(2-metilbutanoil)-6-[(E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil]-4-fenil-2H-cromen-2-ona</p> | $C_{30}H_{34}O_5$ |  <p>R= CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></p>   | <p>Verotta et al. (2004)</p>                         |
| <p><b>(4)</b><br/>5,7-dihidroxi-6-(isobutiril)-8-(3-metilbut-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona</p>                    | $C_{24}H_{24}O_5$ |    | <p>Verotta et al. (2004);<br/>Márquez et. (2015)</p> |
| <p><b>(5)</b><br/>5,7,8-trimetoxi-4-(4-metoxifenil)-2H-chromen-2-ona</p>  | $C_{19}H_{18}O_6$ |   | <p>Köhler et al. (2001)</p>                          |

**(6a)**  
5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-  
7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-  
4-fenilcumarina

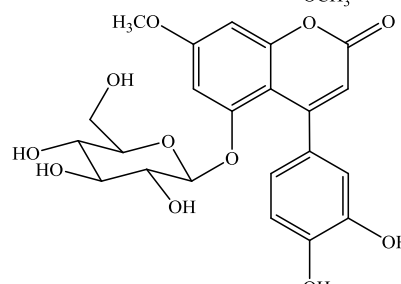
$C_{23}H_{24}O_{11}$



Argotte-  
Ramos et  
al.(2006)

**(6b)**  
5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-  
7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-  
4-fenilcumarina

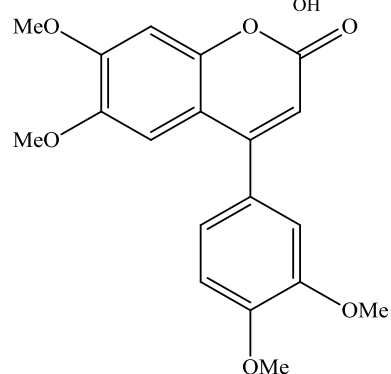
$C_{22}H_{22}O_{11}$



Argotte-  
Ramos et  
al.(2006)

**(7)**  
4-(3',4'-dimetoxifenil)-6,7-  
dimetoxicumarina

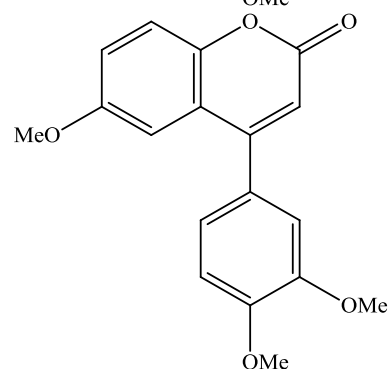
$C_{19}H_{18}O_6$



Pierson et  
al. (2010)

**(8)**  
4-(3',4'-dimetoxifenil)-6-  
metoxicumarina

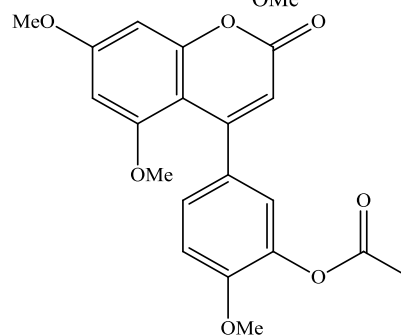
$C_{18}H_{16}O_5$



Pierson et  
al. (2010)

**(9)**  
4-(3'-acetoxi-4'-  
metoxifenil)-5,7-  
dimetoxicumarina

$C_{20}H_{18}O_7$

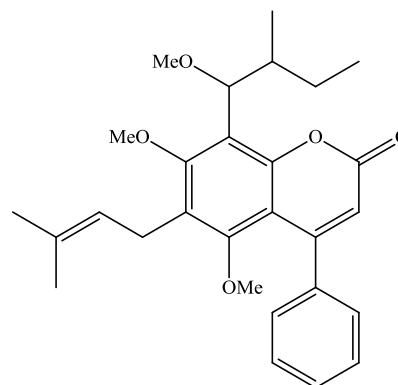


Pierson et  
al. (2010)

|  |                   |  |  |
|--|-------------------|--|--|
| <p><b>(10)</b><br/>4-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-5,6,7-trimetoxicumarina</p>   | $C_{19}H_{18}O_7$ |  | <p>Pierson et al. (2010)</p>   |
| <p><b>(11)</b><br/>(-) mammea A/BB<br/>[1-[5,7-Di-hidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-4-fenil-8-cumarinil]-2-metil-1-butanona]</p> | $C_{25}H_{26}O_5$ |  | <p>Brenzan et al. (2007); Brenzan et al. (2008); Honda et al. (2010); Tiuman et al. (2012)</p> |
| <p><b>(12)</b><br/>5,7-Dihidroxi-8-(2-metilbutanoil)-6-(3-metilbutil)-4-fenil-croman-2-ona</p>                               | $C_{25}H_{30}O_5$ |  | <p>Brenzan et al. (2008)</p>   |
| <p><b>(13)</b><br/>7-hidroxi-5-metoksi-8-(2-metilbutanoil)-6-(3-metilbut-2-en-1-il)-4-fenilcumarina</p>                      | $C_{25}H_{28}O_5$ |  | <p>Brenzan et al. (2008)</p>   |

(14)  
5,7-dimetoxi-8-(1-metoxi-  
2-metilbutil)-6-(3-  
metilbut-2-en-1-il)-4-  
fenilcumarina

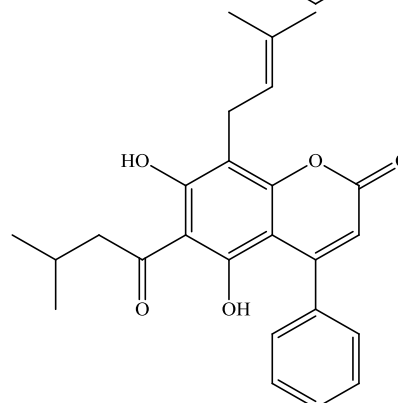
$C_{28}H_{34}O_5$



Brenzan et  
al. (2008)

(15)  
4-fenil-5,7-dihidroxi-6-(3-  
metilbutanoil)-8-(3-metil-  
2-butenil)-2H-1-  
benzopiran-2-ona

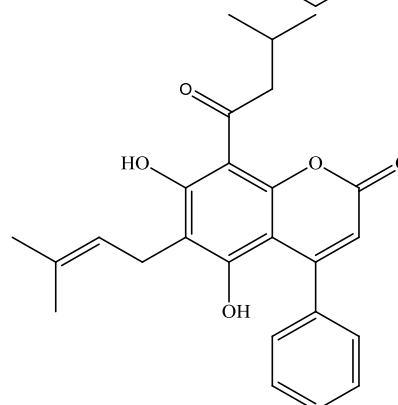
$C_{25}H_{26}O_5$



Reyes et  
al. (2008)

(16)  
5,7-dihidroxi-6-(3-  
metilbut-2-en-1-il)-8-(3-  
metilbutanoil)-4-  
fenilcumarina

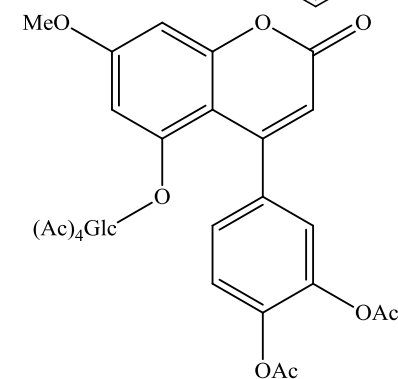
$C_{25}H_{26}O_5$



Reyes et  
al. (2008)

(17)  
5-O-[\beta-D-tetra acetoxi  
glicopiranosil]-3',4'-  
diacetoxi-7-metoxi-4-  
fenilcumarina

$C_{20}H_{15}O_8$

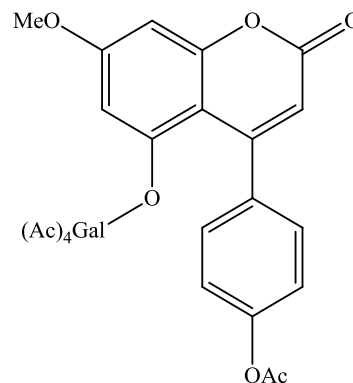


Del Rayo  
et al.  
(2004)



(18)  
5-O-[ $\beta$ -D-tetra acetoxi  
glicopiranosil]-4'-acetil-7-  
metoxi-4-fenilcumarina

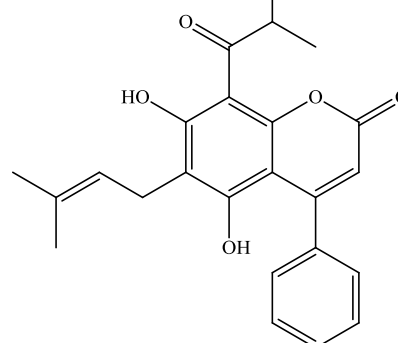
$C_{18}H_{13}O_6$



Del Rayo  
et al.  
(2004)

(19)  
Isomesuol  
([1-[5,7-Di-hidroxi-6-(3-  
metil-2-butenil)-4-fenil-8-  
cumarinil]-2-metil-1-  
propanona])

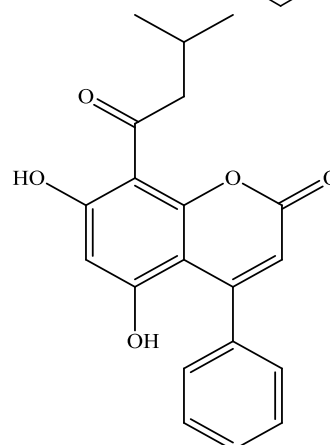
$C_{24}H_{24}O_5$



Márquezet  
al. (2005)

(20)  
5,7-dihidroxi-8-(3-  
metilbutanoil)-4-fenil-2H-  
cromen-2-ona

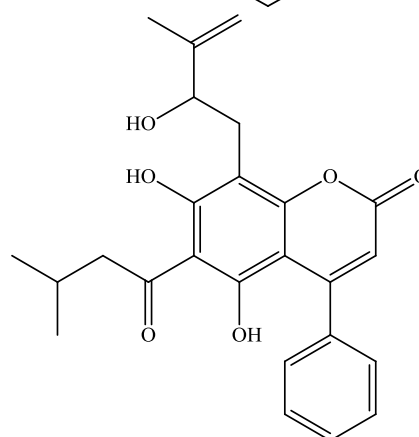
$C_{20}H_{18}O_5$



Bedoyaet  
al. (2005)

(21)  
5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi-  
3-metilbut-3-en-1-il)-6-(3-  
metilbutanoil)-4-fenil-2H-  
cromen-2-ona

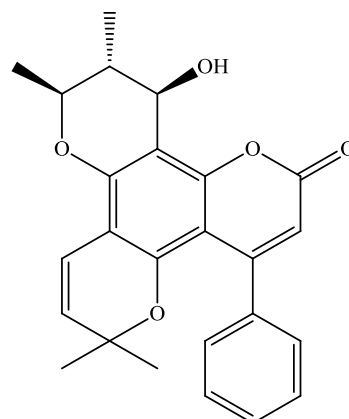
$C_{25}H_{26}O_6$



Bedoyaet  
al. (2005)

**(22)**  
Inofilum B  
[(10*S*,11*S*,12*R*)-12-  
hidroxi-6,6,10,11-  
tetraametil-4-fenil-1,5,9-  
trioxa-6,10,11,12-tetra-  
hidrotrifenilen-2-ona]

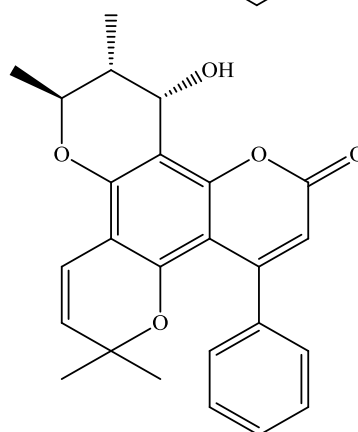
C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>



Patil et al.  
(1993)

**(23)**  
Inofilum P  
[(10*S*,11*S*,12*S*)-12-  
hidroxi-6,6,10,11-  
tetraametil-4-  
fenil-1,5,9-trioxa-  
6,10,11,12-tetra-  
hidrotrifenilen-2-ona]

C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>



Patil et al.  
(1993)

### 3.1.1. Neoflavonoides e atividade antimalária

Há décadas, extratos de várias espécies de plantas, incluindo as que são utilizadas na medicina tradicional, têm sido avaliados *in vitro* para atividade antimalárica (KÖHLER et al., 2001). Em alguns casos, os compostos responsáveis por suas atividades têm sido isolados/caracterizados, sendo que, o presente estudo é uma análise de publicações científicas que descreve pesquisas que destaca os neoflavonoides com potencial terapêutico para a malária. Na presente revisão, foram considerados os neoflavonoides que apresentaram uma CI<sub>50</sub> para atividade antimalárica menor que 20 µg/mL (ZOFOU et al., 2013).

O composto **(1)** 5,7-Dihidroxi-6-(2-metil-butanoil)-8-[(E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil]-4-fenil-2H-cromen-2-ona foi isolado do extrato das flores secas da *Mesua ferrea* L e exibiu atividade significativa *in vitro* contra linhagens de *Plasmodium falciparum* sensível a cloroquina D10 (CQ-S) e resistente a cloroquina W2 (CQ-R) com um valor da CI<sub>50</sub> de 2,74 ± 0,45 µg/ml e 1,17 ± 0,61, respectivamente. A mistura dos compostos **(2a)** 5,7-dihidroxi-6-(2-metil-butanoil)-8-(3-metil-but-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona e **(2b)** 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-butanoil)-8-(3-metil-but-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona também demonstrou ser efetiva contra as linhagens de *Plasmodium falciparum*, apresentando um valor da CI<sub>50</sub> de 8,33 ± 1,06 µg/mL para CQ-S e 7,50 ± 1,24 µg/mL para a CQ-R. Os neoflavonoides **(3)** 5,7-

dihidroxi-8-(2-metil-butanoil)-6-[(E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil]-4-fenil-2H-cromen-2-ona e **(4)** 5,7-dihidroxi-6-(isobutiril)-8-(3-metil-but-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona apresentaram atividade antimalárico com o valor da  $CI_{50}$  próximo a mistura dos compostos **(2a)** e **(2b)**. O composto **(18)** mesuol apresentou um valor da  $CI_{50}$  de  $10,75 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{m}$  para CQ-S e  $8,91 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{ml}$  para a CQ-R (VEROTTA et al., 2004). Em outro estudo, o composto **(18)** mesuol que foi isolado a partir de óleo de semente da *M. ferrea* L (Nagkesar) apresentou atividade imunomoduladora, o que pode ser um indicativo de sua atividade para prevenir doenças infecciosas como as causadas pelos parasitas do gênero *Plasmodium* (CHAHAR et al., 2012).

O composto **(5)** 5,7,8-trimetoxi-4-(4-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona, isolado de um extrato lipofílico da casca de *Exostemamexicanum* (Rubiaceae), exibiu elevada atividade antimalárico *in vitro* contra as linhagens *P. falciparum* sensíveis a cloroquina (poW) e resistente a cloroquina (Dd2) com os valores da  $CI_{50}$  de  $3,6 \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $1,6 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Segundo Köhler et al. (2001), a atividade antimalárico apresentado pelo 5,7,8-trimetoxi-4-(4-metoxifenil)-2H-chromen-2-ona pode ser atribuído ao seu caráter lipofílico, na qual também é uma característica do 5,7-dihidroxi-6-(2-metilbutanoil) -8-[(E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil] -4-fenil-2H-cromen-2-ona.

Os compostos **(6a)** 5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina e **(6b)** 5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-7-metoxi-3',4'-di-hidroxi-4-fenilcumarina, isolados a partir da casca do caule de *Hintonia latiflora* (Sesse & Mociño & DC), exibiram significativa atividade antimalárica *in vitro* contra o desenvolvimento de esquizontes de *P. berghei* com o valor de  $CI_{50}$  de  $24,7 \mu\text{M}$  e  $25,9 \mu\text{M}$ , respectivamente. Confirmando a atividade antimalária *in vitro*, a avaliação do tratamento *in vivo* do 5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina na dose de 40 mg/kg em animais infectados com o parasita *P. berghei* no teste de supressão de quatro dias, mostrou uma supressão da parasitemia de  $19,7 \pm 3,9\%$  e uma supressão no número de esquizontes de  $35,1 \pm 0,04\%$ . Demonstrando ser um antimalárico mais promissor que o 5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina, é destacado uma supressão da parasitemia de  $39,5 \pm 0,8\%$  e uma supressão no número de esquizontes de  $70,8 \pm 0,1\%$  para o 5-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-7-metoxi-3',4'-di-hidroxi-4-fenilcumarina, na qual, todos os animais tratados com este neoflavonoide sobreviveram 15 dias e não mostraram sinais de toxicidade (ARGOTTE-RAMOS et al., 2006).

Até a presente data e de acordo com a pesquisa realizada na literatura científica, apenas um estudo de pesquisa que destaca a atividade contra o gênero *Plasmodium in vivo* foi encontrado e publicado. O potencial para a descoberta de novos agentes antimaláricos a partir dos neoflavonoides foi observado pela primeira vez na literatura científica a partir dos estudos

*in vitro* realizados por Verotta et al. (2004) e Köhler et al. (2001) e subsequentemente com estudos *in vivo* realizado por Argotte-Ramos et al. (2006). Assim, com base nos resultados compilados, os neoflavonoides são promissores compostos antimaláricos, o que enfatiza ainda mais o desenvolvimento de trabalhos futuros com esta classe de composto. Além disso, no que diz respeito à identificação de novos compostos antimaláricos, os neoflavonoides podem ser perfeitamente inseridos nos processos de triagem *in vivo* abordado por Fidock et al. (2004) e Vial et al. (2013).

### 3.1.2. Neoflavonoides e atividade Antileishmania

A leishmaniose está entre as seis principais DTNs e abrange um grupo de doença infecciosa causada por protozoários parasitas unicelulares do gênero *Leishmania* (MAGILL, 2015). Esta doença causa uma alta taxa de morbidade e mortalidade com um amplo espectro de manifestações clínicas (cutâneas, mucocutâneas ou viscerais), sendo que, aproximadamente 12 milhões de pessoas estão atualmente infectadas (OMS, 2016b). Além disso, alguns relatos sugerem que as espécies de *Leishmania* apresentam diferentes graus de resistência às drogas convencionais, o que justifica a busca permanente por novas moléculas com propriedades leishmanicida. Estudos com compostos leishmanicidas obtidos a partir das plantas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (ROHLOFF; HYMETE; TARIKU, 2013; SINGH et al., 2014). Desta forma, a presente revisão apresenta vários neoflavonoides bioativos com promissora atividade leishmanicida.

O **(7)** 4-(3',4'-dimetoxifenil)-6,7-dimetoxicumarina é composto sintetizado e sua atividade antiprotozoária foi avaliada contra amastigotas de *Leishmania donovani*, no qual apresentou uma potente atividade com um baixo valor da  $CI_{50}$  (1,1  $\mu$ M) e um elevado índice de seletividade (SI) no valor de 265, sendo que esse resultado foi maior do que apresentado pela anfotericina B (SI=140) (Tabela 4, p. 62) (PIERSON et al., 2010). Os compostos **(8)** 4-(3',4'-dimetoxifenil)-6-metoxicumarina, **(9)** 4-(3'-acetoxi-4'-metoxifenil)-5,7-dimetoxicumarina e **(10)** 4-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-5,6,7-trimetoxicumarina também foram sintetizados e apresentaram atividade contra o mesmo parasita protozoário com  $CI_{50}$  < 5,5  $\mu$ M e com boa seletividade (SI > 29). A atividade antiprotozoária dos compostos sintetizados apresentaram baixa citotoxicidade em relação as células de monócitos humanos (THP1).

Os estudos de Brenzan et al. (2007) também avaliaram a atividade antiprotozoária e demonstrou o importante papel farmacológico dos neoflavonoides como promissores candidatos a drogas antileishmania. O composto **(11)** (-) mammea A/BB, isolado a partir de um extrato bruto das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), exibiu elevada

atividade *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* com o valor da  $CI_{50}$  de 3,0 e 0,88  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e  $CI_{90}$  de 5,0 e 2,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A atividade antileishimania apresentada pelo **(11)** (-) mammea A/BB foi acompanhado por uma elevada inibição da *L. amazonenses* bem como importantes alterações na ultraestrutura do parasita como inchaço mitocondrial, vacuolização citoplasmática e intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar. Além da atividade antileishimania, o **(11)** (-) mammea A/BB não demonstrou não ser tóxico para células de macrófagos J774-G8.

A atividade antileishimania do neoflavonoide **(11)** (-) mammea A/BB também foi avaliado *in vivo* (camundongos *Balb/c* experimentalmente infectados por *L. amazonenses*) em um tratamento de 30 dias consecutivos. Os resultados demonstram que o tratamento intramuscular ( $1,64 \pm 0,8$  cm) e tópico ( $1,32 \pm 0,57$  cm) com **(11)** (-) mammea A/BB na dose de 18 mg/kg reduziu o tamanho da área lesionada na pata dos camundongos de forma semelhante ao grupo Glucantime ( $1,36 \pm 0,81$  cm) (TIUMAN et al., 2012).

Os compostos **(12)** 5,7-di-hidroxi-8-(2-metil-butanoil)-6-(3-metil-butil)-4-fenil-croman-2-ona, **(13)** 7-hidroxi-5-metoxi-8-(2-metil-butanoil)-6-(3-metil-but-2-en-1-il)-4-fenilcumarina e **(14)** 5,7-dimetoxi-8-(1-metoxi-2-metil-butil)-6-(3-metil-but-2-en-1-il)-4-fenilcumarina são derivados semissintéticos do **(11)** (-) mammea A/BB e também apresentaram promissoras atividades antileishimania (**Tabela 4, p. 62**) (BRENZAN et al., 2008). O composto **(12)** foi mais eficaz na atividade antileishimania contra as formas promastigotas e amastigotas intracelular de *L. amazonensis* quando comparado com **(11)** (-) mammea A/BB. O composto **(12)** também apresentou baixa citotoxicidade contra células de macrófagos J774-G8 com uma concentração de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) de  $85,4 \pm 2,3$   $\mu\text{M}$  e um elevado índice de seletividade (**Tabela 4, p. 62**). O possível mecanismo de ação do **(12)** 5,7-di-hidroxi-8-(2-metilbutanoil)-6-(3-metilbutil)-4-fenil-croman-2-onapode ser mediado pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial das células e desta forma induz a morte do parasita (BRENZAN et al., 2012). É interessante observar que os resultados deste trabalho demonstraram que os vários aspectos das estruturas dos compostos foram importantes para a atividade antileishimania.

**Tabela 4:** Atividade antileishmaniana dos neoflavonoides derivados do **(11)** (-) mammea A/BB contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses*.

| Compostos   | <i>L. amazonenses</i> |       |                         |       |
|-------------|-----------------------|-------|-------------------------|-------|
|             | Promastigota          |       | Amastigota intracelular |       |
|             | CI <sub>50</sub> (µM) | IS    | CI <sub>50</sub> (µM)   | IS    |
| <b>(12)</b> | 0,9 ± 0,1             | 94,8  | 0,6 ± 0,0               | 142,3 |
| <b>(13)</b> | 2,4 ± 0,4             | 39,7  | 34,04 ± 2,6             | 2,8   |
| <b>(14)</b> | 1,9 ± 0,2             | 206,3 | 22,2 ± 3,9              | 17,7  |

Os artigos de revisão de Richard et al. (2010) e Singh et al. (2014) também destacaram os neoflavonoides como compostos promissores com possíveis implicações para o tratamento da leishmaniose. Assim, com base nos resultados compilados em bases de dados científicos, os neoflavonoides são novos compostos com propriedades leishmanicida, o que enfatiza ainda mais o desenvolvimento de futuros trabalhos em comparação a uma ou mais drogas padrãoleishmanicida, de preferência usando modelos *in vivo* e com ênfase especial ao composto **(7)** 4-(3',4'-dimetoxifenil)-6,7-dimetoxicumarina e **(11)** (-) mammea A/BB.

### 3.1.3. Neoflavonoides e atividade antitripanossomose

Tripanossomose americana é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi* que afeta principalmente populações de baixa renda em várias regiões da América Latina e África (NUNES et al., 2013). Assim como observado para outras DTNs, há uma falta de medicamentos tripanocidaseficazes, seguros e acessíveis e os atualmente usados (nifurtimox e do benznidazole) têm várias limitações (**Tabela 2, p. 50-51**). Por esta razão, uma alternativa estratégica está na constante procura por novos medicamentos tripanocidase os produtos naturais demonstram ser importantes compostos bioativos que podem ser destinados ao tratamento da Tripanossomose americana (MUSCHIETTI; SÜLSEN; MARTINO, 2013). Entre os promissores grupos de produtos naturais com potencial atividade tripanocida, podem ser destacados os neoflavonoides a partir de estudos inicialmente *in vitro*.

O composto **(15)** 4-fenil-5,7-di-hidroxi-6-(3-metil-butanoil)-8-(3-metil-2-butenil)-2H-1-benzopirano-2-ona, isolado do extrato hexano da *Mammea americana* (Clusiaceae), exibiu significativa atividade tripanocida *in vitro* contra epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* com o valor da CM<sub>100</sub> (concentração mínima em que todas as epimastigotas e tripomastigotas morrem após 48 horas de tratamento) de 35 e 50 µg/mL, respectivamente (REYES et al., 2008). O composto **(16)** 5,7-di-hidroxi-6-(3-metil-but-2-en-1-il)-8-(3-metil-butanoil)-4-fenilcumarina, isolado das folhas de *C. brasiliense*, também exibiu significativa atividade

tripanocida *in vitro* contra epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* com o valor da  $CM_{100}$  de 15 e 30  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (REYES et al., 2008). O neoflavonoide **(11)** (-) mammea A/BB isolado das folhas de *C. brasiliense*, além da atividade antileishmanicida abordado anteriormente, também apresentou atividade tripanocida *in vitro* contra epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* com o valor da  $CM_{100}$  de 25 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (REYES et al., 2008).

Os compostos **(17)** 5-O-[ $\beta$ -D-tetra acetoxi glicopiranosil]-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcumarina e **(18)** 5-O-[ $\beta$ -D-tetra acetoxi glicopiranosil]-4'-acetil-7-metoxi-4-fenilcumarina foram isolados a partir da *Hintonia latiflora* (Rubiaceae) e exibiram atividade tripanocida *in vitro* contra as formas tripomastigotas de *T. b. brucei* com o valor da  $CI_{50}$  de  $10,73 \pm 1,31 \mu\text{M}$  e  $10,65 \pm 1,15 \mu\text{M}$ , respectivamente (DEL RAYO et al., 2004).

#### 3.1.4. Neoflavonoides e atividade Anti-HIV

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm se dedicado à descoberta de novos produtos naturais antivirais, dentre eles, produtos naturais obtidos das plantas com potencial aplicação médica no tratamento do HIV/SIDA (KURAPATI et al., 2016; TIETJEN et al., 2015; TIETJEN et al., 2016). Assim, as plantas são fontes em potencial de uma ampla variedade de novos agentes antivirais, especialmente compostos com propriedades anti-HIV. Desta forma, a presente revisão apresentaneoflavonoides bioativos com promissora atividade anti-HIV.

Os compostos **(4)** 5,7-di-hidroxi-6-(isobutiril)-8-(3-metil-but-2-enil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona e **(19)** isomesuol foram isolados a partir de folhas e caules de *Marila pluricostata* (Clusiaceae) e exibiram elevada atividade inibitória da replicação do HIV-1 em células humanas de linhagem Jurkat com  $CI_{50}$  de 2 e 2,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (MÁRQUEZ et al., 2005). Para ambos os compostos, 100% de inibição foi observado na concentração de 15  $\mu\text{M}$ . Estes dois compostos não demonstraram citotoxicidade para as células Jurkat. O possível mecanismo envolve a inibição da atividade de transcrição do promotor de HIV-1-LTR através de uma via de sinalização que envolve a fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

Os compostos **(20)** 5,7-di-hidroxi-8-(3-metil-butanoil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona e **(21)** 5,7-di-hidroxi-8-(2-hidroxi-3-metil-but-3-en-1-il)-6-(3-metil-butanoil)-4-fenil-2H-cromen-2-ona foram isolados a partir do extrato diclorometano das folhas de *M. pluricostata* (Clusiaceae) e exibiram elevada atividade anti-HIV pela inibição da transcrição do HIV com o valor da  $CI_{50}$  de 6,9 e 0,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (BEDOYA et al., 2005). Os compostos **(20)** e

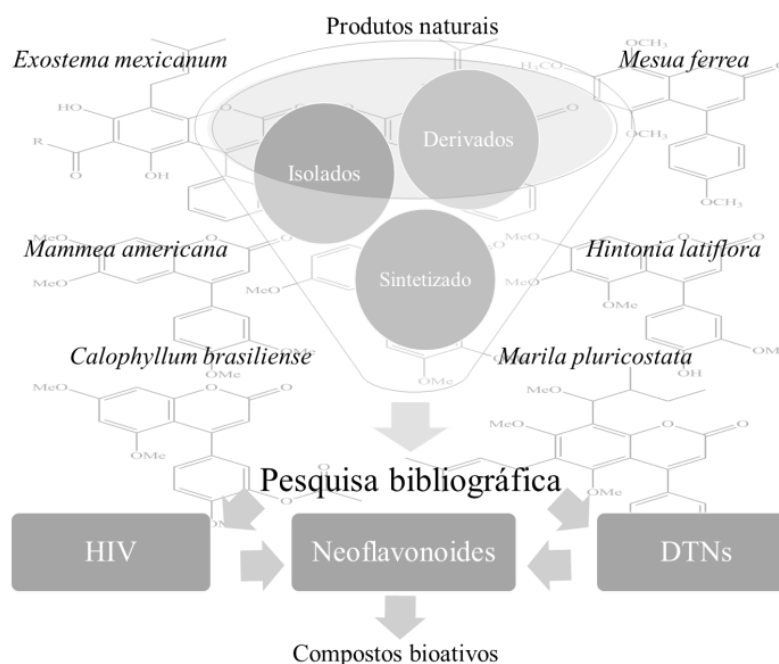
(21) não apresentaram citotoxicidade e atividade anti-HIV pode estar relacionado à inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

Os compostos (22)Inofilum B e (23)Inofilum P também exibiram elevada atividade anti-HIV pela inibição da transcriptase reversa do HIV (RT) com o valor da  $CI_{50}$  de 38 e 130 nM, respectivamente. Ambos os compostos (22) e (23) foram ativos contra o HIV-1 em cultura de células com o valor da  $CI_{50}$  de 1,4 e 1,6  $\mu$ M, respectivamente, e um índice de seletividade de 39 e 16, respectivamente. Além da elevada atividade antiviral, esses dois compostos não apresentaram citotoxicidade no teste XTZ (tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida).

#### 4. Conclusão

Nos últimos anos, produtos naturais derivados das plantas têm sido intensamente investigados para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, e como discutido nesta revisão, vários neoflavonoides tem sido isolada e caracterizada a partir das plantas, bem como sintetizados. Estes produtos naturais foram particularmente ativos contra *P. falciparum*, *L. donovani*, *L. amazonenses* e *T. cruzi*, fornecendo assim, novas possibilidades para o desenvolvimento de novos compostos bioativos que possam futuramente ser utilizado no tratamento de doenças negligenciadas e HIV.

**Figura 2:** Neoflavonoides como compostos bioativos





## Referências

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, n. 1, p. 67-76, 2012.
- ARGOTTE-RAMOS, R.; RAMÍREZ-AVILA, G.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M. D. C.; OVILLA-MUÑOZ, M.; LANZ-MENDOZA, H.; RODRÍGUEZ, M. H.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; ALVAREZ, L. Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the Stem Bark of *Hintonia latiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1442-1444, 2006.
- BEDOYA, L.M.; BELTRÁN, M.; SANCHO, R.; OLMEDO, D.A.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; DEL OLMO, E.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; MUÑOZ, E.; FELICIANO, A.S.; ALCAMÍ, J. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 20, p. 4447-4450, 2005.
- BRENZAN, M.; NAKAMURA, C.; PRADO DIAS FILHO, B.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.
- BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.M.; CÔRREA, A.G.; JÚNIOR, J.A.; DOS SANTOS, A.O.; CORTEZ, D.A.G. Structure-activity relationship of (-) mamea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 651-658, 2008.
- CHAHAR, M. K.; SANJAYA KUMAR, D. S.; LOKESH, T.; MANOHARA, K. P. In-vivo antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 386-391, 2012.
- CHEYNIER, V., COMTE, G., DAVIES, K.M., LATTANZIO, V., MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.
- CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239-247, 2010.
- DEL RAYO CAMACHO, M.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; YARDLEY, V.; SOLIS, P.N. In vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of Some Alkaloids, Quinones, Flavonoids, and Coumarins. **Planta Med**, v. 70, n. 01, p. 70-72, 2004.
- DE VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 16-78, 2016.
- DONNELLY, D. X.; SHERIDAN, M. H. Neoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids**: Springer US, 1988. cap. 6, p.211-232.
- EYTON, W.B.; OLLIS, W.D.; SUTHERLAND, I.O.; GOTTLIEB, O.R.; TAVEIRA MAGALHÃES, M.; JACKMAN, L.M. The neoflavanoid group of natural products—I: Dalbegiones—A new class of quinones. **Tetrahedron**, v. 21, n. 9, p. 2683-2696, 1965.

EYTON, W.B.; OLLIS, W.D.; FINEBERG, M.; GOTTLIEB, O.R.; SALIGNAC DE SOUZA GUIMARÃES, I.; TAVEIRA MAGALHÃES, M. The neoflavanoid group of natural products—II.: The examination of *Machaeriumscleroxylon* and some biogenetic proposal regarding the neoflavanoids. **Tetrahedron**, v. 21, n. 9, p. 2697-2705, 1965b.

FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 6, p. 509-520, 2004.

FINEFIELD, J.M.; SHERMAN, D.H.; KREITMAN, M.; WILLIAMS, R.M. Enantiomeric Natural Products: Occurrence and Biogenesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 20, p. 4802-4836, 2012.

GANINA, O.G.; DARAS, E.; BOURGAREL-REY, V.; PEYROT, V.; ANDRESYUK, A.N.; FINET, J.P.; FEDOROV, A.Y.; BELETSKAYA, I.P.; COMBES, S. Synthesis and biological evaluation of polymethoxylated 4-heteroaryl coumarins as tubulin assembly inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8806-8812, 2008.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; KHILYA, V. P. Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 1, p. 54-121, 2003.

GROTEWOLD, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer, 2006. 2 p.

HONDA, P.A.; FERREIRA, I.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; AMADO, C.A.B.; SILVEIRA, T.G.V.; BREZAN, M.A.; LONARDONI, M.V.C. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 333-338, 2010.

JANNIN, J.; GABRIELLI, A. F. Neurological aspects of neglected tropical diseases: an unrecognized burden. **Handbook of clinical neurology**, v. 114, p. 3-8, 2013.

KHOABI, M.; MOLAVERDI, F.; ALIPOUR, M.; JAFARPOUR, F.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Palladium-catalyzed domino protodecarboxylation/oxidative Heck reaction: regioselective arylation of coumarin-3-carboxylic acids. **Tetrahedron**, v. 69, n. 52, p. 11164-11168, 2013.

KÖHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F.P.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; GONZÁLEZ, J.C.; A, M., HERNÁNDEZ, R.; IBARRA, W.A.; BERENDSOHN, U.G.; BIENZLE, E.; EICH. In vitro Antiplasmodial Activity of 4-Phenylcoumarins from *Exostemamexicanum*. **Planta Med**, v. 67, n. 01, p. 89-91, 2001.

KURAPATI, K. R. V.; ATLURI, V. S. R.; THANGAVEL, S.; GARCIA, G.; NAIR, M. Natural Products as Anti-HIV Agents and Role in HIV-Associated Neurocognitive Disorders (HAND): A Brief Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2016.

MAGILL, A. J. 277 - *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis A2 - Bennett, John E. In: DOLIN, R. e BLASER, M. J. (Ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)**. Philadelphia: Content Repository Only!, 2015. p.3091-3107.e4.

MÁRQUEZ, N.; SANCHO, R.; BEDOYA, L.M.; ALCAMÍ, J.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; FELICIANO, A.S.; FIEBICH, B.L.; MUÑOZ, E. Mesuol, a natural occurring 4-phenylcoumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF- $\kappa$ B pathway. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2–3, p. 137-145, 2005.

MILLER, B. J.; PIETERSE, T.; MARAIS, C.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B. Ring-closing metathesis as a new methodology for the synthesis of monomeric flavonoids and neoflavonoids. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 35, p. 4708-4710, 2012.

MOSKVINA, V. S.; KHILYA, V. P.; TUROV, O. V.; GROTH, U. M. A Versatile Synthesis of Heterocyclic Analogues of Neoflavonoids from Enamino Ketones. **Synthesis**, v. 2009, n. 08, p. 1279-1286, 2009.

MUSCHIETTI, L. V.; SÜLSEN, V. P.; MARTINO, V. S. Chapter 9 - Bioprospection of Potential Trypanocidal Drugs: A Scientific Literature Survey over the Period 2000–2010. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. 39, 2013.

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Neglected tropical diseases. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em 23 de jul. 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em 23 de jul. 2016a.

OLIVEIRA, S. K.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; MASCARELLO, A.; VELEIRINHO, B.; RAMLOV, F.; KUHNEN, S.; YUNES, R. A.; MARASCHIN, M. Chapter 2 - From Bench to Bedside: Natural Products and Analogs for the Treatment of Neglected Tropical Diseases (NTDs). In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. 44, 2015. p.33-92.

OLIVEIRA, G. L.; DE FREITAS, R. M. Diminazene aceturate—An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 138-157, 2015.

PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; EGGLESTON, D.S.; HALTIWANGER, R.C.; BEAN, M.F.; TAYLOR, P.B.; CARANFA, M.J.; BREEN, A.L.; BARTUS, H.R. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 26, p. 4131-4138, 1993.

PANDEY, R. P.; PARAJULI, P.; KOFFAS, M. A. G.; SOHNG, J. K. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 634-662, 2016.

PIERSON, J.-T., DUMÈTRE, A., HUTTER, S., DELMAS, F., LAGET, M., FINET, J.-P., AZAS, N., COMBES, S. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-aryl coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 864-869, 2010.

RAO, M. M.; SESHADRI, T. R. Components of the heartwood of *dalbergia larifolia*, roxb. **Tetrahedron Letters**, v. 4, n. 4, p. 211-215, 1963.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑOZ, E.; VEGA-AVILA, E.; ABE, F.; KINJO, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 431-436, 2008.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 447-455, 2010.

ROHLOFF, J.; HYMETE, A.; TARIKU, Y. Chapter 11 - Plant-Derived Natural Products for the Treatment of Leishmaniasis. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. 39, 2013. p.381-429.

SCHMIDT, T.; A. KHALID, S.; J. ROMANHA, A.; MA. ALVES, T.; W. BIAVATTI, M.; BRUN, R.; B. DA COSTA, F.; L. DE CASTRO, S.; F. FERREIRA, V.; V.G. DE LACERDA, M.; H.G. LAGO, J.; L. LEON, L.; P. LOPES, N.; C. DAS NEVES AMORIM, R.; NIEHUES, M.; V. OGUNGBE, I.; M. POHLIT, A.; T. SCOTTI, M.; N. SETZER, W.; DE N.C. SOEIRO, M.; STEINDEL, M.; G. TEMPONE, A. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part II. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012.

SELEPE, M.; VAN HEERDEN, F. Application of the Suzuki-Miyaura Reaction in the Synthesis of Flavonoids. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4739-4765, 2013.

SINGH, N.; MISHRA, B.B.; BAJPAI, S.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2177-2215, 2005.

TIETJEN, I.; NTIE-KANG, F.; MWIMANZI, P.; ONGUÉNÉ, P. A.; SCULL, M. A.; IDOWU, T. O.; OGUNDAINI, A. O.; MEVA'A, L. M.; ABEGAZ, B. M.; RICE, C. M.; ANDRAE-MAROBELA, K.; BROCKMAN, M. A.; BRUMME, Z. L.; FEDIDA, D. Screening of the Pan-African Natural Product Library Identifies Ixoratannin A-2 and Boldine as Novel HIV-1 Inhibitors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121099, 2015.

TIUMAN, T.S.; BRENZAN, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. **Phytochemistry**, v. 19, n. 13, p. 1196-1199, 2012.

VELIŠEK, J.; DAVÍDEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of food constituents: Natural pigments. Part 2 - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 2, p. 73-98, 2008.

VEROTTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, P.V.; NERI, M.G.; RAIMONDI, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2867-2879, 2004.

VIAL, H.; TARAMELLI, D.; BOULTON, I.; WARD, S.; DOERIG, C.; CHIBALE, K. CRIMALDDI: platform technologies and novel anti-malarial drug targets. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 396, 2013.

ZOFOU, D.; NTIE-KANG, F.; SIPPL, W.; EFANGE, S. M. N. Bioactive natural products derived from the Central African flora against neglected tropical diseases and HIV. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 8, p. 1098-1120, 2013.

YAJIMA, A.; MIKHAILOV, A.; MBABAZI, P.S.; GABRIELLI, A.F.; MINCHIOTTI, S.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D. Preventive Chemotherapy and Transmission Control (PCT) databank: a tool for planning, implementation and monitoring of integrated preventive chemotherapy for control of neglected tropical diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 4, p. 215-222, 2012.

Perfil toxicológico agudo e em doses repetidas do neoflavonoide  
7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina em camundongos *Swiss*

## 5. CAPÍTULO II

(Capítulo submetido à *Regulatory Toxicology and Pharmacology*)

Qualis B1

## **Perfil toxicológico agudo e em doses repetidas do neoflavonoide 7-acetoxi-4- aril-3,4-di-hidrocurmarina em camundongos *Swiss***

### **RESUMO**

Os neoflavonoides, que são classificados em 4-arilcurmarina (neoflavona), 3,4-dihidro-4-arilcurmarina e neoflavene, têm sido alvo de vários estudos com relação a seu potencial terapêutico e, apesar das promissoras atividades farmacológicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, existe uma falta de estudos que demonstrem as suas propriedades toxicológicas. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias) do neoflavonoide sintético 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina em camundongos *Swiss* pelos parâmetros relacionados às alterações do peso corporal, consumo de alimento e água, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os estudos de toxicidade aguda (300 e 2000 mg/kg) e em doses repetidas (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral foram realizados conforme a diretriz 423 e 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, foram verificados durante o tratamento com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina ausência de sintomas clínicos adversos e mortalidade em qualquer animal submetido ao estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas. Além disso, não foram observadas alterações significativas no peso corporal e dos órgãos internos, consumo de alimento e água, parâmetros hematológicos e bioquímicos quando comparado com o grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem uma compreensão inicial do perfil de toxicidade do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina, no qual pode ser considerado como sendo um neoflavonoide com toxicidade superior a 2000 mg/kg em camundongos *Swiss*.

**Palavras-chave:** 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina, neoflavonoides, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas.

## 1. Introdução

Quimicamente, os neoflavonoides são subdividido de acordo com a sua estrutura química em 4-arilcumarina (neoflavona), 3,4-dihidro-4-arilcumarina e neoflavene (GLÁUCIO et al., 2017). São compostos naturais encontrados em espécies de plantas dos gêneros *Mesua* (Clusiaceae), *Marila* (Clusiaceae), *Mammea*(Clusiaceae), *Calophyllum* (Calophyllaceae), *Kielmeyera* (Clusiaceae), *Ochrocarpus* (Clusiaceae), *Hintonia* (Rubiaceae), *Exostema* (Rubiaceae), *Coutarea* (Rubiaceae), *Dorstenia* (Moraceae), *Passiflora* (Passifloraceae), *Dalbergia* (Leguminosae) e *Machaerium* (Leguminosae) (DONNELLY; SHERIDAN, 1988; GARAZD; GARAZD; KHILYA, 2003; PANDEY; SOHNG, 2013). Adicionalmente, os neoflavonoides têm sido cada vez mais isolados e caracterizados a partir de uma ampla gama de famílias de plantas superiores.

Mas, há também o interesse pelo desenvolvimento de protocolos experimentais com o objetivo de síntese orgânica que tem ampliado as propriedades farmacológicas dessa classe de composto como inibidores da 5-lipoxigenase (YANG et al., 2015), atividade apoptótica contra as células leucêmicas (BILLARD et al., 2008), anti-HIV (OLMEDO et al., 2017), antitumoral (SITNIKOV et al., 2015; MUTAI et al., 2017), antibacteriano (SUN et al., 2012; VESELINOVIĆ et al., 2015), antiosteoporótico (KUMAR et al., 2014), antileishmania(PIERSON et al., 2010), anticâncer (MALYSHEVA et al., 2013), atividade antiplasmodial(PIERSON et al., 2010), hipoglicemiante (CRISTIANS et al., 2014), imunomoduladore antioxidante (FREITAS et al., 2014; DANIS et al., 2016).

Assim, os neoflavonoidestêm sido alvo de vários estudos com relação a seu potencial terapêutico e apesar das promissoras ações farmacológicas demonstradas *in vitro* e *in vivo*, há ainda uma falta de estudos toxicológicos que demonstre sua segurança pré clínica. A realização de experimentos contínuos que visam avaliar possíveis efeitos adversos desse grupo de composto é de suma importância e, nesse contexto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a toxicidade aguda e em doses repetidas do neoflavonoide sintético 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina em camundongos *Swiss* pelos parâmetros relacionados às alterações do peso corporal, consumo de alimento, ingestãode água, parâmetros hematológicos e bioquímicos, peso de órgãos após necropsia e biomarcadores de estresse oxidativo.



## 2. Material e métodos

### 2.1. Reagentes químicos e instrumentos

Para as colunas cromatográficas (CC) e para as CCDC em placas foram utilizadas sílica gel 60 (200 - 400 *mesh*, *Acros*) e sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (*Sigma*), respectivamente. Os dados de RMN foram registrados em espectrômetro *Varianmod. Gemini 2000* operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C,  $\delta$  em ppm e foi utilizado como referência interna o TMS ou resíduo do solvente não deuterado. Os espectros obtidos na região do infravermelho foram obtidos por meio de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) usando o equipamento modelo *IRAffinity-1* da *Shimadzu*. As amostras foram preparadas na forma de filme líquido sobre pastilha de brometo de potássio (KBr) ou na forma sólida dispersa em KBr anidro.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro CGMS-QP2010 da *Shimadzu*®, através de injeção direta, ionização por impacto de elétrons (70 eV), com fonte de íons a 300 °C e com variação da temperatura de 80–340 °C a 20 °C/minutos. Os pontos de fusão foram determinados no equipamento da Microquímica e não foram corrigidos. Todos os reagentes utilizados foram de qualidade P.A e obtidos da *Merck*® ou *Acros Organics*®.

### 2.2. Síntese do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina

O ácido polifosfórico foi preparado seguindo os procedimentos descritos por Majumder, Chatterjee e Mukhoti (2001). Assim, foram adicionados em um balão de 50 mL, 12,5 gramas de anidrido fosfórico (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 20 mL de ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (D = 1,75 g/mL). A mistura formada foi aquecida a 100 °C sob agitação vigorosa pelo tempo de 3 horas. Após este tempo, foi desligado o aquecimento e agitação, sendo que o sistema foi mantido em repouso até atingir temperatura ambiente para obtenção de uma mistura viscosa de cor cristalina.

Em um balão de fundo redondo contendo 20 mL de ácido polifosfórico, à temperatura ambiente, foram adicionados 9,09 mmol de ácido cinâmico e 9,09 mmol de resorcinol. A mistura foi aquecida à temperatura de 80 °C, sob agitação, por três horas. Em seguida o meio reacional foi tratado com água gelada e a mistura extraída com clorofórmio (3 x 20 mL). A fase orgânica foi separada, tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido

à coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60 tipo “*flash*” usando  $\text{CHCl}_3$  como eluente, para fornecer o composto 4-*aril*-7-hidroxi-3,4-di-hidroxicumarina com 69% de rendimento.

A acetilação da 4-*aril*-7-hidroxi-3,4-di-hidroxicumarina foi realizada partindo-se de 500 mg (2,08 mmol) dessa substância e adição de anidrido acético (1,1 equiv.), piridina (2 equiv.), em presença de quantidades catalíticas de dimetilaminopiridina (DMAP), sob agitação constante e mantendo-se a mistura à temperatura ambiente por 12 horas. A reação foi acompanhada por CCDC, que evidenciou a formação de um único produto. Em seguida, foi vertido água gelada no meio reacional, e a mistura extraída com  $\text{CHCl}_3$  (3 x 20 mL). A fase orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado usando-se coluna “*flash*” eluindo com  $\text{CHCl}_3$  para fornecer o neoflavonoide 7-Acetoxi-4-*aril*-3,4-di-hidroxicumarina com rendimentos de 81%.

O neoflavonoide 4-*aril*-7-hidroxi-3,4-di-hidroxicumarina foi obtido na forma de sólido branco com PF (°C) 137-139 (141-142). EMIE (70 eV)  $m/z$  (%): 240 ( $\text{M}^+$ , 85), 222 (12), 212 (22), 197 (100), 163 (6), 91 (5), 77 (12), 63 (6). IV (KBr): 3460, 3026, 2908, 1735, 1508, 1452, 1277, 1141, 1030. RMN de  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , (ppm)]: 9,81 (*s*, OH), 7,15-7,50 (*m*, H-2'-H-6'), 6,82 (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-5), 6,55 (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-6), 6,63 (*s*, H-8), 4,36 (*t*,  $J = 7,2$  Hz, H-4), 3,10 (*dd*,  $J = 7,2$  e 13,2 Hz, H-3a e H-3b). RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , (ppm)]: 167,9 (C-2), 157,7 (C-7), 153,0 (C-9), 141,9 (C-1'), 120,9 (C-5), 128,6 (C-2', C-6'), 127,2 (C-3', C-5'), 127,1 (C-4'), 116,1 (C-10), 111,8 (C-6), 109,5 (C-8), 38,6 (C-4), 36,7 (C-3).

O 7-acetoxi-4-*aril*-3,4-di-hidroxicumarina foi obtido na forma de sólido branco com PF (°C) 84-86 (85-86). EMIE (70 eV)  $m/z$  (%): 282 ( $\text{M}^+$ , 12), 240 (100), 222 (45), 212 (15), 197 (83), 163 (6), 115 (23), 100 (13), 91 (5), 77 (12). IV (KBr): 3050, 3026, 2908, 2850, 1750, 1738, 1568, 1520, 1452, 1350, 1152, 1135, 1036.

### 2.3. Animais

Os Camundongos *Swiss* de ambos os sexos pesando entre 25-30 g foram obtidos a partir do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais utilizados foram mantidos em temperatura controlada ( $24 \pm 1$  °C) em ciclo de 12 horas claro/escuro e com livre acesso à água filtrada disponível em garrafas graduadas e comida (*pellets* de ração Purina). Todos os animais utilizados foram mantidos em gaiolas de polipropileno com o máximo de cinco animais por gaiola e inicialmente aclimatados por sete dias antes da realização dos experimentos.

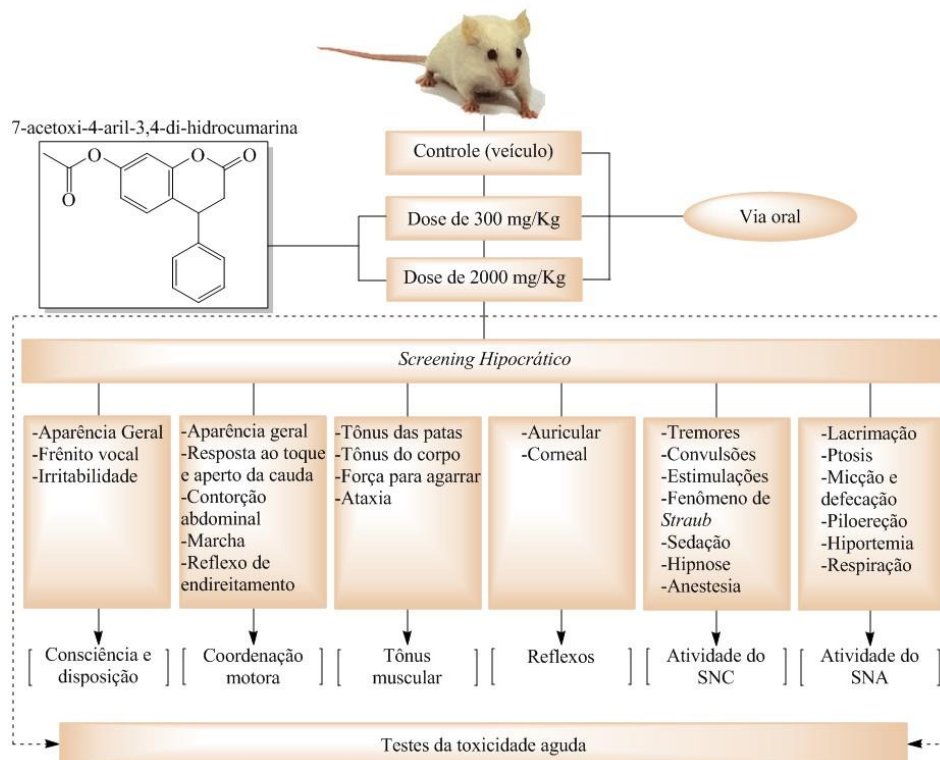
Todos os esforços foram feitos para minimizar tanto o sofrimento quanto o número de animais utilizados, sendo que cada experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI#013/11) e realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (BRASIL, 2016).

#### 2.4. Estudo da toxicidade aguda (14 dias)

O estudo da toxicidade aguda foi realizado de acordo com a diretriz 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2001). O 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina foi emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado por via oral apenas uma única vez nas doses de 300 (n=5) e 2000 mg/kg (n=5) para avaliação detalhada dos sinais clínicos de toxicidade (Exemplos: aparência geral, ataxia, frêmito vocal, irritabilidade, tônus do corpo, tremores, salivação, lacrimejamento, ptose palpebral, convulsões e movimentos anormais) e mortalidade dos animais (SILVA et al., 2016). O grupo controle (n=5) recebeu apenas veículo com o mesmo volume (10 mL/kg) e pela mesma via que os outros grupos tratados. Todos os grupos de animais foram cuidadosamente monitorados continuamente por 1 hora após as dosagens e periodicamente durante as primeiras 24 horas para um total de 14 dias (**Figura 1**).

**Figura 1:** Protocolo experimental para avaliação da toxicidade aguda com camundongos *Swiss*.



**Legenda:** (SNC) Sistema Nervoso Central, (SNA) Sistema Nervoso Autônomo.

## **2.5. Estudo da toxicidade em doses repetidas (28 dias)**

O estudo de toxicidade em doses repetidas foi realizado de acordo com a diretriz 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2008). O 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocomarina foi emulsificado em Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo) e administrado diariamente uma vez ao dia em um total de 28 dias por via oral nas doses de 250 (n=5), 500 (n=5) e 1000 (n=5) mg/kg para avaliação dos sinais clínicos de toxicidade descrito na toxicidade aguda e mortalidade dos animais. As doses de 250, 500 e 1000 mg/kg foram estabelecidas a partir do cálculo da dose descrito na diretriz 407 da OECD. O grupo controle recebeu apenas veículo com o mesmo volume (10 mL/kg) e pela mesma via que os outros grupos tratados. Todos os grupos de animais foram cuidadosamente monitorados continuamente por 1 hora após as dosagens e periodicamente durante as primeiras 24 horas para um total de 28 dias, seguindo o procedimento descrito na **Figura 1 (p. 75)**.

## **2.6. Análise dos dados fisiológicos**

O peso corporal, consumo de água e ração, formação de urina e fezes de cada animal foram registrados diariamente do início ao décimo quarto dia durante o período de tratamento com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocomarina para a toxicidade aguda. No estudo de doses repetidas, os dados fisiológicos foram registrados diariamente do início do tratamento ao vigésimo oitavo dia.

## **2.7. Urinálise**

Amostras de urina de 4 horas de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocomarina no estudo de toxicidade aguda foram colhidas para análise semi-qualitativa de bilirrubina, urobilinogênio, cetonas, glicose, proteína, sangue, nitrito, leucócitos, pH e densidade utilizando tiras de urina (Uriquest Plus/Labtest). No estudo de toxicidade em doses repetidas, amostras de urina da última semana foram colhidas e analisadas usando o mesmo princípio das reações químicas da tira reagente Uriquest. A análise da cor de urina foi realizada com amostras de urina fresca. O volume da urina foi verificado diariamente.

## **2.8. Necropsia**

Após o período final de tratamento com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocomarina no estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas, os animais foram anestesiados com solução

de xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g [8,75mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (10mg/mL)] conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education* descrito por Flecknell (1996) e Kohn (1997). Logo em seguida foi feita a coleta de sangue pela punção cardíaca do ventrículo direito dos animais anestesiados (ASIEDU-GYEKYE et al., 2014). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, sendo um com anticoagulante EDTA para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro sem anticoagulante para obtenção do soro e determinação dos parâmetros bioquímicos.

Sucedida à eutanásia, foi feita avaliação macroscópica dos órgãos e logo em seguida foi determinado o peso absoluto e relativo dos seguintes órgãos; cérebro, pulmões, fígado, coração, baço e rins. O peso relativo dos órgãos em estudo foi calculado utilizando a fórmula:  $\text{Peso relativo do órgão (\%)} = (\text{peso do órgão} / \text{peso do camundongo}) \times 100$ .

## **2.9. Análise dos parâmetros hematológicos**

Os parâmetros de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematologia (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (SANTANA et al., 2013).

## **2.10. Análise dos parâmetros bioquímicos**

Após a coleta do sangue, foi realizado um processo de centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro e determinação dos parâmetros de glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), colesterol e triglicerídeos. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®.

## **2.11. Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim**

Uma parte do fígado e rim dos animais submetidos ao estudo de toxicidade em doses repetidas foi colhida após eutanásia e homogeneizado (10%, p/v) em solução gelada de tampão fosfato de sódio 50 Mm (pH 7,4). Os homogenatos de cada órgão foram centrifugados

em 8000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes separados para determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo.

### **2.11.1. Atividade da Catalase e Superóxido dismutase**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de decomposição do  $H_2O_2$  utilizando espectrofotometria (240 nm) e os resultados foram expressos em unidades de atividade da catalase por miligrama de proteína (U/mg proteína) (AEBI, 1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol e os resultados determinados por espectrofotometria (420 nm) foram expressos em unidades de atividade da SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína) (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os níveis de proteína foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951).

### **2.11.2. Níveis de peroxidação lipídica, nitrito e glutathiona reduzida**

A peroxidação lipídica foi avaliada indiretamente pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme o procedimento experimental descrito por Freitas et al. (2009) e os resultados determinados utilizando espectrofotometria (532 nm) foram expressos em nmol de TBARS por miligrama de proteína (nmol/mg proteína). Os níveis de nitrito foram determinados usando reagente de Griess [1% de sulfanilamida em ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina] conforme o procedimento experimental descrito por Almeida et al. (2012) e os resultados determinados por espectrofotometria (540 nm) foram expressos em  $\mu M$  a partir de uma curva padrão de nitrito usando nitrato de sódio ( $NaNO_2$ ). A glutathiona reduzida (GSH) foi avaliada usando DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) conforme o procedimento experimental descrito por Freitas et al. (2009) e os resultados obtidos por espectrofotometria (412 nm) foram expressos em  $\mu mol$  de GSH por miligrama de proteína ( $\mu mol/mg$  proteína).

## **2.12. Estudo da toxicidade em *Artemia salina***

A toxicidade em *A. salina* foi realizada conforme o método descrito por Meyer et al. (1982) com modificações. Resumidamente, ovos (60 mg) de *A. salina* foram colocados em um béquer de 250 ml contendo água do mar artificial ( $NaCl$ , 36 g/L) para eclodirem por 24 horas na presença de luz fluorescente. Após a eclosão, dez náuplios de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaios contendo 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina em várias concentrações (6,25-100  $\mu g/mL$ ). Um controle negativo (sem o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-

hidrocoumarina) e controle positivo (dicromato de potássio, 6,25-100 µg/mL) foram realizados simultaneamente. O experimento foi realizado em triplicata e repetido 3 vezes. Após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento a temperatura ambiente, foi realizado a contagem das larvas mortas de *A. salina* e os resultados expressos como porcentagem de mortalidade (LEITE et al., 2015).

### 2.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média) e a avaliação estatística foi realizada através da análise de variância (*one way* ANOVA) seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. Somente os resultados do peso corporal foram analisados utilizando *two-way* ANOVA seguida pelo teste *Newman-Keuls* como *post hoc*. Os resultados da análise estatística entre os grupos avaliados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (*GraphPad Prism* 6.01).

## 3. Resultados

### 3.1. Toxicidade aguda e em doses repetidas

Ausência de sinais clínicos adversos e mortalidade em qualquer animal submetido ao estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas foram verificados durante o tratamento com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Efeitos do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina em animais no estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

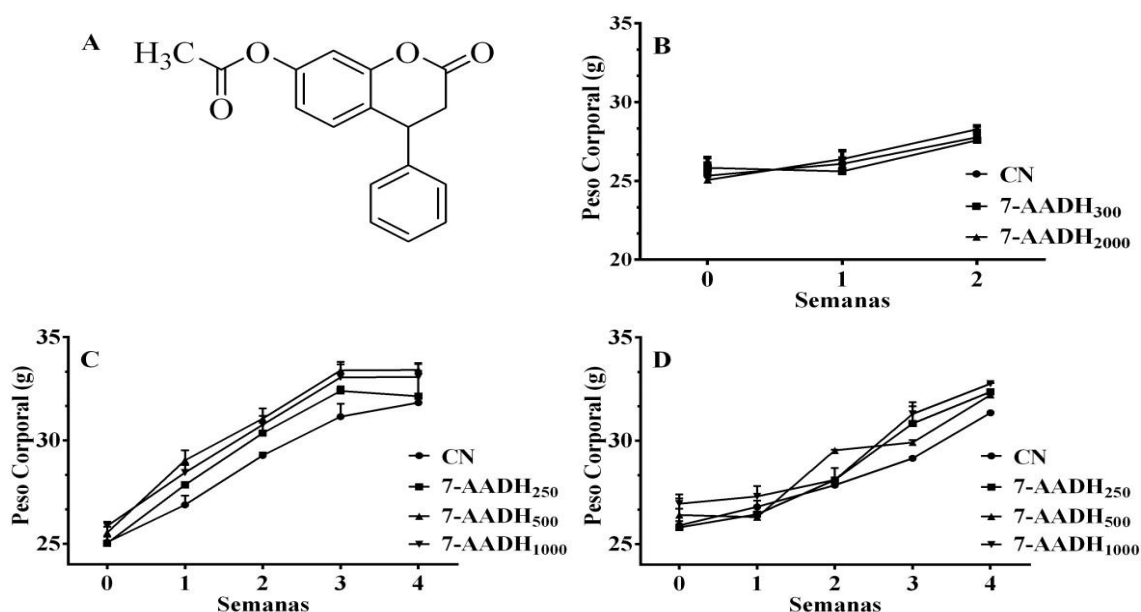
| Toxicidade                 | M/T | Mortalidade (%) | Latência para Mortalidade (min) | Sinais de Toxicidade |
|----------------------------|-----|-----------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>Aguda</b>               |     |                 |                                 |                      |
| CN                         | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>300</sub>      | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>2000</sub>     | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| <b>Doses repetidas(AF)</b> |     |                 |                                 |                      |
| CN                         | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| <b>Doses repetidas(AM)</b> |     |                 |                                 |                      |
| CN                         | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 0/5 | 0               | –                               | Nenhum               |

(CN) Controle negativo (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos, (M) Animais Mortos, (T) Animais totais. Os valores representam a média ± E.P.M.

### 3.2. Peso corporal

Alterações no peso corporal absoluto dos grupos de animais tratados por via oral com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina e o grupo controle estão apresentados na **Figura 2**. Para a dose de 300 e 2000 mg/kg do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina, os animais não apresentaram variações significativas no peso quando comparado com o grupo controle até o 14º dia de avaliação da toxicidade aguda ( $p>0,05$ ) (**Figura 2B**). Assim como demonstrado na toxicidade em dose única, os grupos de animais de ambos os sexos tratados com doses repetidas (250, 500 e 1000 mg/kg) não apresentaram variações estatísticas significativa no peso absoluto até a quarta semana (28º dia) de estudo quando comparado com os grupos controles ( $p>0,05$ ) (**Figura 2C e 2D**).

**Figura 2:** Resultados do peso corporal de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (7-AADH, **A**) no estudo de toxicidade aguda (**B**) e em doses repetidas em animais fêmeas (**C**) e machos (**D**).



(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). Os valores representam a média ± E.P.M.



### 3.3. Consumo de ração, água e formação de urina e fezes

Conforme os resultados descritos na **Tabela 2 (p. 82)** para a toxicidade aguda, os animais tratados por via oral com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina nas doses de 300 e 2000 mg/kg não apresentaram alterações significativas quando comparado com o grupo controle nos resultados de consumo de ração, água, formação de fezes e urina ( $p>0,05$ ). Semelhança na obtenção dos resultados foi demonstrada no estudo de toxicidade em doses repetidas, uma vez que não foi observado diferenças significativas nos grupos de animais de ambos os sexos tratados com as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg quando comparado com os grupos controles ( $p>0,05$ ) (**Tabela 2, p. 82**).

### 3.4. Peso absoluto e relativo dos órgãos

O peso médio absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina e do grupo controle estão demonstrados na **Tabela 3 (p. 84)**. Em ambos os estudos de toxicidade, nenhuma alteração significativa foi observada em qualquer órgão dos animais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina quando comparado com os grupos controles ( $p>0,05$ ). Além disso, uma análise macroscópica dos órgãos internos (baço, fígado, rins, coração, cérebro e pulmões) não mostrou hemorragias, hematomas, edemas, necrose, alterações de posição, forma, tamanho, cor e consistência quando comparado com os grupos controles, sugerindo que o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina não induz desordem morfológica nos estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas.

**Tabela 2:** Resultados do consumo de ração, água, formação de urina e fezes de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidroumarina (7-AADH) durante o estudo de toxicidade aguda(14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

| Toxicidade                  | Dados Fisiológicos   |                      |                      |                       |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                             | Ração (g/animal/dia) | Água (mL/animal/dia) | Fezes (g/animal/dia) | Urina (mL/animal/dia) |
| <b>Aguda (AF)</b>           |                      |                      |                      |                       |
| <b>1ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 7,40 ± 0,07          | 12,89 ± 0,29         | 2,38 ± 0,10          | 1,17 ± 0,03           |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 7,95 ± 0,53          | 13,55 ± 1,92         | 2,59 ± 0,18          | 1,10 ± 0,05           |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 8,17 ± 0,14          | 13,44 ± 1,28         | 2,56 ± 0,12          | 1,13 ± 0,13           |
| <b>2ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 8,08 ± 0,12          | 14,00 ± 1,01         | 2,51 ± 0,35          | 1,15 ± 0,04           |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 8,02 ± 0,18          | 12,89 ± 0,91         | 2,87 ± 0,09          | 1,18 ± 0,12           |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 8,56 ± 0,34          | 13,57 ± 0,48         | 2,80 ± 0,15          | 1,31 ± 0,16           |
| <b>Doses repetidas (AF)</b> |                      |                      |                      |                       |
| <b>1ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 8,03 ± 0,32          | 12,56 ± 0,86         | 2,24 ± 0,38          | 1,29 ± 0,10           |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 8,01 ± 0,07          | 15,00 ± 0,57         | 2,06 ± 0,05          | 1,30 ± 0,12           |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 8,55 ± 0,14          | 13,33 ± 0,50         | 2,45 ± 0,19          | 1,18 ± 0,12           |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 8,51 ± 0,33          | 14,12 ± 1,61         | 2,23 ± 0,02          | 1,27 ± 0,11           |
| <b>2ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 8,13 ± 1,05          | 12,89 ± 0,11         | 2,13 ± 0,06          | 1,21 ± 0,11           |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 8,47 ± 0,15          | 13,29 ± 0,46         | 2,09 ± 0,66          | 1,14 ± 0,17           |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 8,59 ± 0,38          | 12,44 ± 0,94         | 2,52 ± 0,12          | 1,31 ± 0,11           |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 9,54 ± 0,37          | 13,60 ± 1,37         | 2,43 ± 0,20          | 1,34 ± 0,03           |
| <b>3ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 8,46 ± 1,17          | 11,5 ± 0,67          | 2,20 ± 0,05          | 1,31 ± 0,04           |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 9,30 ± 0,37          | 13,89 ± 0,78         | 2,26 ± 0,14          | 1,24 ± 0,06           |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 8,80 ± 0,58          | 13,66 ± 0,89         | 2,43 ± 0,18          | 1,35 ± 0,03           |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 10,10 ± 0,17         | 14,11 ± 1,05         | 2,55 ± 0,21          | 1,26 ± 0,11           |
| <b>4ª semana</b>            |                      |                      |                      |                       |
| CN                          | 9,28 ± 0,32          | 13,61 ± 0,87         | 2,13 ± 0,02          | 1,40 ± 0,07           |

|                            |              |              |             |             |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 9,19 ± 0,45  | 14,00 ± 0,33 | 2,49 ± 0,17 | 1,31 ± 0,13 |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 9,04 ± 0,21  | 13,02 ± 0,84 | 2,23 ± 0,27 | 1,32 ± 0,05 |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 9,68 ± 0,53  | 13,78 ± 0,86 | 2,62 ± 0,09 | 1,34 ± 0,10 |
| <b>Doses repetidas(AM)</b> |              |              |             |             |
| <b>1ª semana</b>           |              |              |             |             |
| CN                         | 9,30 ± 0,46  | 12,33 ± 1,45 | 2,59 ± 0,22 | 1,80 ± 0,06 |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 8,75 ± 0,81  | 12,97 ± 0,26 | 2,72 ± 0,07 | 1,89 ± 0,28 |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 10,42 ± 0,23 | 12,67 ± 1,63 | 2,94 ± 0,23 | 1,74 ± 0,18 |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 11,32 ± 0,11 | 13,20 ± 1,92 | 3,11 ± 0,22 | 1,96 ± 0,31 |
| <b>2ª semana</b>           |              |              |             |             |
| CN                         | 10,23 ± 0,34 | 13,57 ± 1,70 | 2,54 ± 0,31 | 1,98 ± 0,19 |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 11,24 ± 0,42 | 13,23 ± 1,31 | 3,50 ± 0,31 | 1,91 ± 0,20 |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 12,21 ± 0,05 | 12,83 ± 1,25 | 3,34 ± 0,24 | 1,70 ± 0,34 |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 11,56 ± 0,07 | 12,75 ± 1,31 | 3,40 ± 0,37 | 1,85 ± 0,07 |
| <b>3ª semana</b>           |              |              |             |             |
| CN                         | 11,50 ± 0,63 | 12,83 ± 0,92 | 3,09 ± 0,37 | 2,16 ± 0,37 |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 12,59 ± 0,13 | 12,73 ± 1,28 | 3,04 ± 0,50 | 2,02 ± 0,19 |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 11,60 ± 0,34 | 11,93 ± 1,16 | 3,22 ± 0,22 | 1,83 ± 0,23 |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 12,01 ± 0,44 | 12,96 ± 1,42 | 1,17 ± 0,12 | 1,97 ± 0,30 |
| <b>4ª semana</b>           |              |              |             |             |
| CN                         | 10,77 ± 0,52 | 12,17 ± 1,64 | 3,11 ± 0,17 | 2,09 ± 0,5  |
| 7-AADH <sub>250</sub>      | 11,56 ± 0,08 | 13,57 ± 0,90 | 3,74 ± 0,18 | 2,15 ± 0,25 |
| 7-AADH <sub>500</sub>      | 11,35 ± 0,45 | 13,40 ± 1,76 | 3,81 ± 0,23 | 2,34 ± 0,14 |
| 7-AADH <sub>1000</sub>     | 10,97 ± 0,40 | 13,77 ± 1,34 | 3,68 ± 0,26 | 2,41 ± 0,15 |

(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg

(n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos.

Os valores representam a média ± E.P.M.

**Tabela 3:** Resultados do peso absoluto e relativo dos órgãos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidroumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

| Órgãos                   | Toxicidade aguda (AF) |                      |                        | Toxicidade em doses repetidas (AF) |                      |                      | Toxicidade em doses repetidas (AM) |             |                      |                      |                        |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|-------------|----------------------|----------------------|------------------------|
|                          | CN                    | 7AADH <sub>300</sub> | 7-AADH <sub>2000</sub> | CN                                 | 7AADH <sub>250</sub> | 7AADH <sub>500</sub> | 7-AADH <sub>1000</sub>             | CN          | 7AADH <sub>250</sub> | 7AADH <sub>500</sub> | 7-AADH <sub>1000</sub> |
| <b>Peso absoluto (g)</b> |                       |                      |                        |                                    |                      |                      |                                    |             |                      |                      |                        |
| Baço                     | 0,12 ± 0,04           | 0,09 ± 0,04          | 0,14 ± 0,01            | 0,14 ± 0,05                        | 0,12 ± 0,04          | 0,18 ± 0,03          | 0,12 ± 0,01                        | 0,09 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01          | 0,09 ± 0,01          | 0,11 ± 0,01            |
| Fígado                   | 1,20 ± 0,07           | 1,27 ± 0,08          | 1,26 ± 0,11            | 1,08 ± 0,03                        | 1,15 ± 0,08          | 1,17 ± 0,05          | 1,21 ± 0,03                        | 1,45 ± 0,05 | 1,46 ± 0,03          | 1,51 ± 0,02          | 1,48 ± 0,06            |
| Rins                     | 0,33 ± 0,03           | 0,36 ± 0,02          | 0,40 ± 0,03            | 0,41 ± 0,03                        | 0,38 ± 0,03          | 0,43 ± 0,08          | 0,42 ± 0,01                        | 0,37 ± 0,01 | 0,39 ± 0,02          | 0,41 ± 0,02          | 0,40 ± 0,03            |
| Coração                  | 0,15 ± 0,08           | 0,16 ± 0,01          | 0,14 ± 0,01            | 0,16 ± 0,07                        | 0,15 ± 0,03          | 0,17 ± 0,01          | 0,19 ± 0,01                        | 0,13 ± 0,05 | 0,15 ± 0,01          | 0,15 ± 0,01          | 0,13 ± 0,01            |
| Cérebro                  | 0,43 ± 0,09           | 0,40 ± 0,01          | 0,41 ± 0,08            | 0,45 ± 0,06                        | 0,40 ± 0,02          | 0,41 ± 0,05          | 0,43 ± 0,02                        | 0,38 ± 0,07 | 0,38 ± 0,01          | 0,42 ± 0,01          | 0,40 ± 0,01            |
| Pulmões                  | 0,19 ± 0,01           | 0,18 ± 0,02          | 0,17 ± 0,01            | 0,17 ± 0,02                        | 0,16 ± 0,03          | 0,19 ± 0,03          | 0,20 ± 0,01                        | 0,14 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01          | 0,16 ± 0,01          | 0,17 ± 0,01            |
| <b>Peso relativo(%)</b>  |                       |                      |                        |                                    |                      |                      |                                    |             |                      |                      |                        |
| Baço                     | 0,38 ± 0,01           | 0,33 ± 0,01          | 0,45 ± 0,04            | 0,45 ± 0,02                        | 0,38 ± 0,01          | 0,55 ± 0,08          | 0,35 ± 0,04                        | 0,31 ± 0,03 | 0,32 ± 0,02          | 0,31 ± 0,01          | 0,33 ± 0,01            |
| Fígado                   | 3,88 ± 0,02           | 4,25 ± 0,28          | 4,19 ± 0,38            | 3,53 ± 0,12                        | 3,63 ± 0,02          | 3,51 ± 0,17          | 3,65 ± 0,17                        | 4,70 ± 0,18 | 4,66 ± 0,10          | 4,74 ± 0,06          | 4,57 ± 0,18            |
| Rins                     | 1,08 ± 0,09           | 1,23 ± 0,09          | 1,34 ± 0,01            | 1,33 ± 0,13                        | 1,22 ± 0,11          | 1,28 ± 0,02          | 1,29 ± 0,03                        | 1,21 ± 0,03 | 1,24 ± 0,01          | 1,30 ± 0,01          | 1,25 ± 0,01            |
| Coração                  | 0,49 ± 0,02           | 0,52 ± 0,04          | 0,45 ± 0,03            | 0,51 ± 0,23                        | 0,49 ± 0,11          | 0,51 ± 0,05          | 0,59 ± 0,05                        | 0,43 ± 0,02 | 0,47 ± 0,02          | 0,48 ± 0,02          | 0,41 ± 0,03            |
| Cérebro                  | 1,40 ± 0,03           | 1,34 ± 0,04          | 1,35 ± 0,02            | 1,47 ± 0,22                        | 1,27 ± 0,12          | 1,22 ± 0,01          | 1,28 ± 0,07                        | 1,23 ± 0,02 | 1,23 ± 0,02          | 1,32 ± 0,01          | 1,25 ± 0,01            |
| Pulmões                  | 0,63 ± 0,05           | 0,60 ± 0,07          | 0,58 ± 0,05            | 0,56 ± 0,08                        | 0,51 ± 0,09          | 0,57 ± 0,01          | 0,60 ± 0,04                        | 0,46 ± 0,04 | 0,50 ± 0,01          | 0,53 ± 0,01          | 0,54 ± 0,04            |

(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos. Os valores representam a média ± E.P.M.

### 3.5. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

De acordo com os resultados descritos na **Tabela 4 (p. 86)** para a toxicidade aguda e em doses repetidas, os animais tratados por via oral com 7-acetoxi-4-aril-3,4-dihidrocumarina não apresentaram alterações estatísticas significativas nos resultados dos parâmetros hematológicos quando comparado com os grupos controles ( $p > 0,05$ ). Semelhança na obtenção dos resultados foi demonstrada nos parâmetros bioquímicos descritos na **Tabela 5 (p. 87)**, uma vez que não foi observado diferenças estatísticas significativas relacionados a atividade hepática (ALT e AST), atividade renal (ureia e creatinina) e biomarcadores metabólicos (glicose, triglicerídeos e colesterol) nos grupos de animais de ambos os sexos tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-dihidrocumarina quando comparado com os grupos controles ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 4 e 5, p. 86**).

### 3.6. Urinálise

Na avaliação da urina dos animais submetidos aos estudos de toxicidade aguda e em doses repetidas, não foram detectadas alterações relacionadas com a administração das doses do 7-acetoxi-4-aril-3,4-dihidrocumarina indicativo de toxicidade quando comparado com os animais dos grupos controle (**Tabela 6, p. 88**).

**Tabela 4:** Resultados dos parâmetros hematológicos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidroumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade de aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

| Toxicidade                  | Parâmetros Hematológicos                         |                       |                    |              |              |                              |   |   |
|-----------------------------|--|-----------------------|--------------------|--------------|--------------|------------------------------|---|---|
|                             | Hemácias<br>(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) | Hemoglobina<br>(g/dL) | Hematócrito<br>(%) | VCM<br>(fL)  | HCM<br>(pg)  | CHCM<br>(g/dL <sup>3</sup> ) | Plaquetas<br>(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | Leucócitos totais<br>(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) |
| <b>Aguda (AF)</b>           |  |                       |                    |              |              |                              |   |   |
| CN                          | 6,50 ± 0,56                                      | 14,20 ± 0,75          | 41,77 ± 3,25       | 67,33 ± 3,95 | 25,03 ± 1,53 | 32,23 ± 1,01                 | 715,7 ± 41,82                                     | 6,39 ± 0,54   |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 6,38 ± 0,60                                      | 13,07 ± 0,62          | 39,33 ± 1,85       | 73,87 ± 6,07 | 24,53 ± 2,02 | 33,17 ± 0,03                 | 652,3 ± 63,8                                      | 5,63 ± 0,36   |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 5,56 ± 0,51                                      | 13,43 ± 0,13          | 40,33 ± 0,33       | 73,90 ± 8,10 | 23,53 ± 3,45 | 33,30 ± 0,05                 | 738,7 ± 31,12                                     | 4,46 ± 0,24   |
| <b>Doses repetidas (AF)</b> |  |                       |                    |              |              |                              |   |   |
| CN                          | 7,82 ± 0,51                                      | 11,30 ± 0,92          | 40,50 ± 3,28       | 51,67 ± 0,88 | 20,03 ± 0,92 | 27,87 ± 0,03                 | 667,3 ± 32,4                                      | 3,60 ± 0,86   |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 7,67 ± 1,06                                      | 11,58 ± 0,52          | 37,03 ± 1,56       | 52,90 ± 5,77 | 21,43 ± 0,38 | 29,53 ± 0,41                 | 678,3 ± 13,7                                      | 4,83 ± 0,40   |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 7,65 ± 0,26                                      | 10,67 ± 1,24          | 38,57 ± 1,37       | 49,67 ± 2,03 | 22,33 ± 2,10 | 29,80 ± 0,92                 | 670,3 ± 14,52                                     | 3,90 ± 0,11   |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 6,84 ± 0,39                                      | 11,13 ± 0,46          | 39,97 ± 0,53       | 57,67 ± 1,31 | 22,77 ± 1,65 | 30,53 ± 0,52                 | 680,0 ± 17,32                                     | 5,23 ± 0,62   |
| <b>Doses repetidas (AM)</b> |  |                       |                    |              |              |                              |   |   |
| CN                          | 5,21 ± 0,15                                      | 12,50 ± 0,06          | 37,33 ± 0,33       | 48,33 ± 0,85 | 24,00 ± 0,72 | 53,20 ± 2,98                 | 610,7 ± 12,72                                     | 3,73 ± 0,29   |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 4,89 ± 0,20                                      | 13,43 ± 0,12          | 22,03 ± 1,12       | 44,70 ± 0,50 | 30,03 ± 1,76 | 59,20 ± 5,16                 | 603,3 ± 54,56                                     | 2,80 ± 0,41   |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 6,63 ± 0,86                                      | 13,17 ± 0,43          | 37,77 ± 0,14       | 52,50 ± 1,82 | 23,07 ± 2,66 | 36,77 ± 2,97                 | 645,0 ± 26,10                                     | 3,06 ± 0,14   |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 5,21 ± 0,50                                      | 13,60 ± 0,95          | 22,83 ± 1,63       | 45,60 ± 0,25 | 28,03 ± 0,74 | 55,23 ± 7,56                 | 655,7 ± 36,84                                     | 4,90 ± 0,37   |

(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos. Volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina corpuscular média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), Os valores representam a média ± E.P.M.

**Tabela 5:** Resultados dos parâmetros bioquímicos de animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade aguda (14 dias) e em doses repetidas (28 dias).

| Toxicidade                  | Parâmetros bioquímicos |                  |                       |                        |               |               |                       |                         |
|-----------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|------------------------|---------------|---------------|-----------------------|-------------------------|
|                             | Glicose<br>(mg/dL)     | Ureia<br>(mg/dL) | Creatinina<br>(mg/dL) | Ácido úrico<br>(mg/dL) | ALT<br>(U/mL) | AST<br>(U/mL) | Colesterol<br>(mg/dL) | Triglicédeos<br>(mg/dL) |
| <b>Aguda (AF)</b>           |                        |                  |                       |                        |               |               |                       |                         |
| CN                          | 129,40 ± 7,78          | 30,67 ± 4,63     | 0,45 ± 0,06           | 3,52 ± 0,32            | 45,17 ± 5,68  | 104,3 ± 3,71  | 56,33 ± 4,48          | 61,67 ± 7,53            |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 125,7 ± 5,92           | 30,33 ± 1,85     | 0,49 ± 0,02           | 4,63 ± 0,46            | 40,33 ± 8,87  | 88,67 ± 3,38  | 47,67 ± 2,66          | 57,33 ± 4,05            |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 128,3 ± 9,35           | 31,33 ± 4,05     | 0,53 ± 0,14           | 3,92 ± 0,21            | 43,33 ± 2,90  | 106,2 ± 8,38  | 46,10 ± 3,21          | 58,67 ± 3,28            |
| <b>Doses repetidas (AF)</b> |                        |                  |                       |                        |               |               |                       |                         |
| CN                          | 121,4 ± 5,07           | 41,01 ± 4,77     | 0,31 ± 0,09           | 2,66 ± 0,28            | 50,25 ± 3,32  | 127,8 ± 4,15  | 46,14 ± 5,44          | 56,43 ± 5,79            |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 116,3 ± 2,02           | 32,67 ± 4,97     | 0,44 ± 0,13           | 3,55 ± 0,72            | 44,10 ± 2,08  | 115,30 ± 4,9  | 42,30 ± 3,15          | 50,67 ± 3,18            |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 109,7 ± 5,04           | 33,31 ± 5,92     | 0,29 ± 0,04           | 3,83 ± 0,58            | 49,33 ± 5,81  | 131,7 ± 5,18  | 46,50 ± 4,36          | 59,17 ± 0,32            |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 113,7 ± 3,18           | 37,60 ± 3,23     | 0,34 ± 0,03           | 3,51 ± 0,41            | 41,00 ± 0,57  | 113,3 ± 2,40  | 38,37 ± 2,95          | 49,64 ± 2,99            |
| <b>Doses repetidas (AM)</b> |                        |                  |                       |                        |               |               |                       |                         |
| CN                          | 116,7 ± 4,91           | 39,67 ± 2,40     | 0,26 ± 0,03           | 3,02 ± 0,27            | 53,67 ± 2,66  | 102,3 ± 6,93  | 93,00 ± 4,35          | 49,67 ± 2,18            |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 118,9 ± 1,97           | 32,00 ± 2,88     | 0,29 ± 0,03           | 3,03 ± 0,35            | 55,00 ± 2,64  | 99,33 ± 7,53  | 92,00 ± 5,13          | 42,00 ± 3,46            |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 121,3 ± 2,60           | 37,33 ± 3,29     | 0,25 ± 0,02           | 3,42 ± 0,36            | 59,67 ± 7,31  | 108,3 ± 8,09  | 97,33 ± 2,90          | 47,67 ± 1,33            |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 110,7 ± 3,93           | 36,33 ± 2,72     | 0,28 ± 0,02           | 3,48 ± 0,20            | 60,67 ± 3,84  | 99,17 ± 3,92  | 101,3 ± 2,90          | 41,21 ± 2,80            |

(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5),

(7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT).

(F) Animais Fêmeas, (M) Animais Machos. Os valores representam a média ± E.P.M.

**Tabela 6:** Resultados da urinalise deanimais tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina (7-AADH) no estudo de toxicidade aguda e em doses repetidas.

| Toxicidade                  | N° de animais | Urinalise   |     |                |     |         |     |         |     |           |     |        |
|-----------------------------|---------------|-------------|-----|----------------|-----|---------|-----|---------|-----|-----------|-----|--------|
|                             |               | Bilirrubina |     | Urobilinogênio |     | Cetonas |     | Glicose |     | Proteínas |     | Sangue |
|                             |               | (-)         | (N) | (-)            | (T) | (-)     | (T) | (N)     | (N) | (T)       | (T) | (-)    |
| <b>Aguda (AF)</b>           |               |             |     |                |     |         |     |         |     |           |     |        |
| CN                          | 5             | 5           | 5   | 4              | 1   | 5       | 5   | 5       | 2   | 3         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 2   | 3         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 5             | 5           | 5   | 4              | 1   | 5       | 5   | 5       | 1   | 4         | 5   |        |
| <b>Doses repetidas (AF)</b> |               |             |     |                |     |         |     |         |     |           |     |        |
| CN                          | 5             | 5           | 5   | 4              | 1   | 5       | 5   | 5       | 1   | 4         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 1   | 4         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 1   | 4         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 5             | 5           | 5   | 4              | 1   | 5       | 5   | 5       | 0   | 5         | 5   |        |
| <b>Doses repetidas (AM)</b> |               |             |     |                |     |         |     |         |     |           |     |        |
| CN                          | 5             | 5           | 5   | 4              | 1   | 5       | 5   | 5       | 3   | 2         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 2   | 3         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 4   | 1         | 5   |        |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 5             | 5           | 5   | 5              | 0   | 5       | 5   | 5       | 2   | 3         | 5   |        |

(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5),

(7- AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos. Bilirrubina:

(-)Negative. Cetonas:(-) Negativo, 1+ = Traços = < 50 mg/dL. Glicose: (N) Normal = < 50 mg/dL. Proteínas:(T) Traços = < 30 mg/dL, 30 = 30 mg/dL.

Sangue:(-) Negativo.



Continuação da Tabela 6.

| Toxicidade                  | Nº de animais | Urinalise |     |       |     |     | Leucócitos<br>(-) | Densidade*<br>(-) | Cor<br>(Amarelo claro) |
|-----------------------------|---------------|-----------|-----|-------|-----|-----|-------------------|-------------------|------------------------|
|                             |               | Nitrito   | pH  |       |     |     |                   |                   |                        |
|                             |               | (-)       | (6) | (6,5) | (7) | (8) |                   |                   |                        |
| <b>Aguda (AF)</b>           |               |           |     |       |     |     |                   |                   |                        |
| CN                          | 5             | -         | 2   | 2     | 1   | 0   | 1.017 ± 0.004     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>300</sub>       | 5             | -         | 2   | 1     | 2   | 0   | 1.020 ± 0.005     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>2000</sub>      | 5             | -         | 1   | 2     | 1   | 1   | 1.022 ± 0.006     | -                 | 5                      |
| <b>Doses repetidas (AF)</b> |               |           |     |       |     |     |                   |                   |                        |
| CN                          | 5             | -         | 3   | 1     | 1   | 0   | 1.012 ± 0.004     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 5             | -         | 2   | 2     | 0   | 1   | 1.008 ± 0.001     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 5             | -         | 3   | 2     | 0   | 0   | 1.018 ± 0.004     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 5             | -         | 2   | 2     | 0   | 1   | 1.015 ± 0.002     | -                 | 5                      |
| <b>Doses repetidas (AM)</b> |               |           |     |       |     |     |                   |                   |                        |
| CN                          | 5             | -         | 2   | 2     | 1   | 0   | 1.013 ± 0.001     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>250</sub>       | 5             | -         | 1   | 2     | 2   | 0   | 1.013 ± 0.006     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>500</sub>       | 5             | -         | 3   | 2     | 0   | 0   | 1.010 ± 0.005     | -                 | 5                      |
| 7-AADH <sub>1000</sub>      | 5             | -         | 2   | 2     | 1   | 0   | 1.015 ± 0.002     | -                 | 5                      |

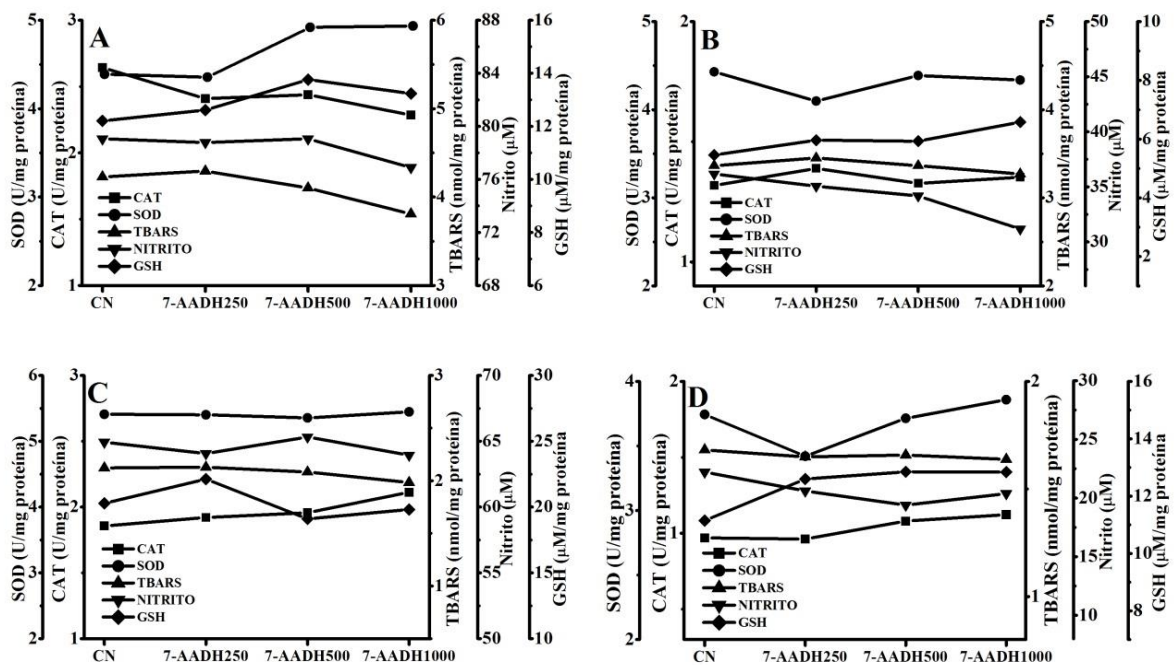
(CN) Controle (n=5), (7-AADH<sub>300</sub>) dose de 300 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>2000</sub>) dose de 2000 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (AF) Animais Fêmeas, (AM) Animais Machos.

\* Os valores da densidade representam a média ± E.P.M. Nitrito: (-) Negativo. Leucócitos: (-) Negativo.

### 3.7. Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rim

Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo (CAT, SOD, TBARS, GSH e nitrito) nos fígados e rins dos animais de ambos os sexos submetidos ao estudo de toxicidade em doses repetidas demonstraram ausência de alterações significativas relacionadas com a administração das doses de 250, 500 e 1000mg/kg do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina quando comparado com os resultados dos grupos controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 2A-D).

**Figura 3:** Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e rins dos animais tratados com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina (7-AADH) após o estudo de toxicidade em doses repetidas (28 dias).



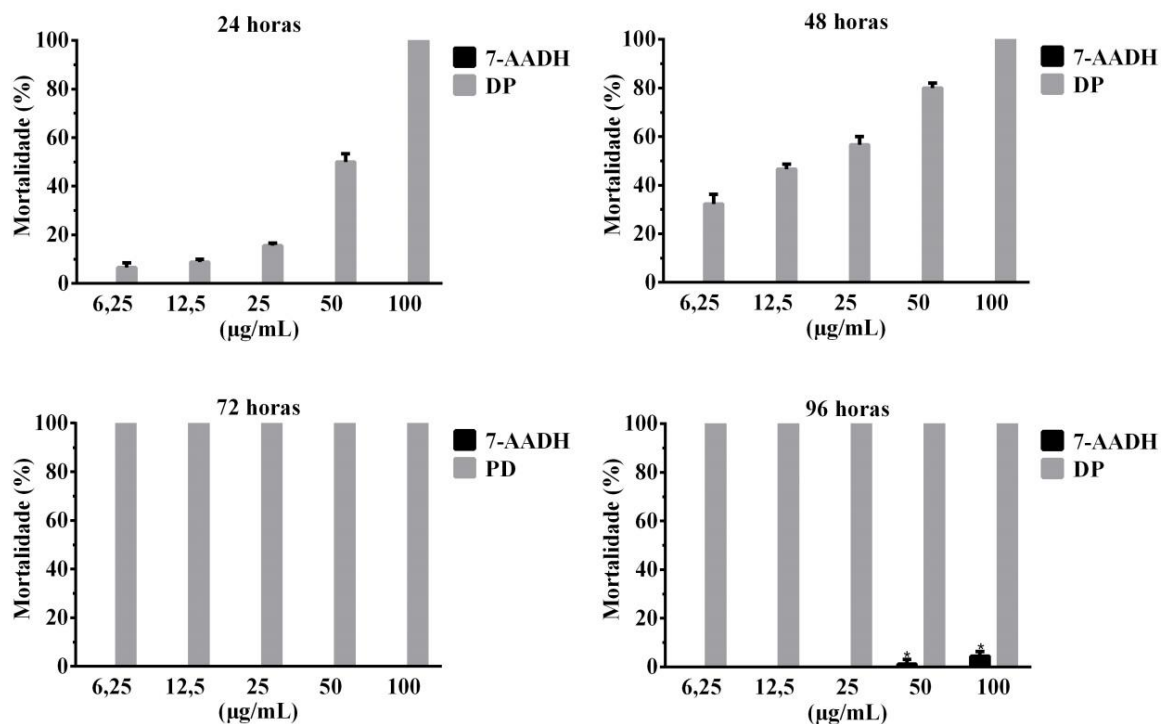
(CN) Controle negativo (n=5), (7-AADH<sub>250</sub>) dose de 250 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>500</sub>) dose de 500 mg/kg (n=5), (7-AADH<sub>1000</sub>) dose de 1000 mg/kg (n=5). (A) Fígados de Animais Machos, (B) Rins de Animais Machos, (C) Fígados de Animais Fêmeas, (D) Rins de Animais Fêmeas. Os valores representam a média ± E.P.M.

### 3.8. Toxicidade em *A. salina*

O 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina a partir da menor concentração até 100 μg/mL demonstrou não ser tóxico nos intervalos de 24, 48 e 72 h, uma vez que não houve mortalidade (Figura 4, p. 91). No entanto, foi observado somente no período de 96 h que as concentrações

de 50 e 100 µg/mL apresentaram uma taxa de mortalidade que foi estatisticamente significativa quando comparado com os resultados do dicromato de potássio.

**Figura 4:** Porcentagem de mortalidade das *A. salina* na presença do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina (7-AADH) em várias concentrações (6,25-100 µg/mL).



Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes em triplicata. \*  $p < 0,05$  em relação ao dicromato de potássio (DP, 6,25-100 µg/mL) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

#### 4. Discussão

Conforme discutido por Saldanha et al. (2017), há uma expansão dos estudos farmacológicos com os neoflavonoides por vários grupos de pesquisas na última década e poucos têm abordado parâmetros toxicológicos em modelos animais. Sendo uma classe de composto com propriedades farmacológicas relevantes, o tratamento em roedores com os neoflavonoides abrange uma gama de doses em que não são discutidos os efeitos clínicos de toxicidade. Assim, o desenvolvimento de pesquisas para elucidar o perfil toxicológico dessa classe de composto é importante e o presente estudo apresenta os primeiros resultados de toxicidade em dose única e em doses repetidas do neoflavonoide 7-acetoxi-4-aryl-3,4-dihidrocumarina em camundongos *Swiss*.

Os resultados obtidos da toxicidade demonstraram que a administração das doses de 250, 300, 500, 1000 e 2000 mg/kg de 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina por via oral em camundongos *Swiss* não induziu qualquer efeito adverso como ptoses, contorções abdominais, reflexo de endireitamento, irritabilidade, piloereção, tônus muscular, tremores e convulsões. Adicionalmente, os resultados obtidos demonstraram que a administração do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina em camundongos *Swiss* de ambos os sexos não interferiu na atividade exploratória espontânea e não provocou relaxamento muscular quando comparado com o grupo controle da toxicidade aguda e em doses repetidas. Sendo assim, os resultados obtidos demonstraram que uma alta dose do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina (1000 ou 2000 mg/kg) não causa efeitos neurocomportamentais adversos.

No presente estudo, não foi registado morte durante a avaliação da toxicidade em dose única e em doses repetidas durante o período de exposição com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina. Assim, a toxicidade desse neoflavonoide pode ser classificada na categoria 5 (toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal) do Sistema globalmente harmonizado de classificação (GHS) da diretriz 423 da OECD (OECD, 2001). Destacando outros modelos de estudos discutidos na literatura científica, ZHANG et al. (2014) demonstrou que cinco neoflavonoides sintetizados não apresentaram qualquer sinal de toxicidade oral (mortalidade e viabilidade) em larvas de *Galleria mellonella*, bem como não apresentaram citotoxicidade em eritrócitos de coelhos em concentrações de até 200 µg/mL.

Os estudos toxicológicos abordados no presente estudo fornecem várias informações sobre os dados fisiológicos de camundongos *Swiss* tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina. Segundo Silva et al. (2016), o surgimento de grandes alterações no peso de animais em estudos para avaliação de toxicidade aguda e sub-crônica são considerados importantes indicadores de possíveis efeitos adversos de uma determinada substância avaliada. Assim, foi observada na **Figura 2 (p. 80)** uma variação não significativa ( $p > 0,05$ ) de até 5% no aumento de peso corporal dos animais em tratamento durante o estudo de toxicidade em doses repetidas quando comparado com o grupo controle, sugerindo que o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina não compromete a fisiologia dos animais como a absorção de nutrientes. Além do resultado demonstrado na **Figura 2 (p. 80)**, os camundongos *Swiss* tratados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina não apresentaram comprometimentos no consumo de água e ração, formação de urina e fezes quando comparado com o grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas conforme descrito na **Tabela 2 (p. 82)**.

A redução no peso dos órgãos internos de animais como roedores é considerado um potencial indicativo de toxicidade após tratamento com uma substância tóxica (Silva et al., 2016). Sendo assim, o peso dos órgãos foi registrado no presente estudo como um possível indicador de propriedades tóxicas do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina. Em relação aos resultados da **Tabela 3 (p. 84)** que mostram os pesos absolutos e relativos dos órgãos internos de camundongos *Swiss*, não houve diferença estatística quando comparado com os resultados dos animais do grupo controle do estudo de toxicidade em dose única e em doses repetidas, confirmando os outros resultados já discutidos que demonstraram ausência de comprometimento toxicológico.

O sistema hematopoiético é bastante susceptível aos compostos com propriedades tóxicas e por isso serve como um importante indicador do estado fisiológico e patológico de animais em estudos toxicológicos (RAMAIAH; BOUNOUS; ELMORE, 2013). No presente estudo, após o tratamento com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina por via oral em várias doses, não foram demonstradas alterações nos parâmetros hematológicos que indicasse toxicidade quando comparado com os grupos controles dos estudos de toxicidade em dose única e em doses repetidas. Assim, é sugerido que o neoflavonoide em estudo não apresenta hematoxicidade.

Além da avaliação hematológica, foi realizado uma análise dos parâmetros bioquímicos séricos que podem demonstrar possíveis efeitos toxicológicos em diferentes órgãos como o rim e o fígado. Sendo assim, os indicadores de alteração na função hepática (ALT e AST) e renal (ureia e creatinina), bem como os indicadores metabólicos (glicose, triglicerídeos e colesterol) foram avaliados. Os resultados descritos nas **Tabelas 5 (p. 87)** para o 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina demonstram que as variações nos valores de todos os pareamentos bioquímicos não indicou toxicidade quando comparado com os valores dos grupos controle, sugerindo ausência principalmente de efeitos adversos como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Além disso, os principais biomarcadores de estresse oxidativo (CAT, SOD, GSH e TBARS) nos tecidos hepáticos e renais dos animais indicaram que o tratamento com 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina não compromete o equilíbrio redox de ambos os órgãos.

Além dos modelos de estudo em roedores, o teste alternativo com o microcrustáceo *A.salina*, que devido à disponibilidade comercial e rapidez, tem sido utilizado para determinar a citotoxicidade de várias substâncias químicas (LEITE et al., 2015). Os resultados destacados na **Figura 4 (p. 90)** demonstram que o 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocoumarina não foi tóxico

para as *A. salina* nas primeiras 72 horas de tratamento, sendo observado uma pequena taxa de mortalidade apenas em 92 horas de tratamento a partir da concentração de 50 µg/mL.

## 5. Conclusão

Em conclusão, os resultados do presente estudo fornecem uma compreensão inicial do perfil de toxicidade do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina. De acordo com os resultados da toxicidade aguda realizado segundo a diretriz 423 da OECD, o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina pode ser classificado como um composto com toxicidade superior a 2000 mg/kg de peso corporal. Além do estudo em dose única com camundongos *Swiss* fêmeas, os resultados em doses repetidas mostraram ausência de letalidade e comprometimento toxicológico fisiológicos, comportamentais, hematológicos e bioquímicos.

## Referências

- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: LESTER, P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 105, 1984. p.121-126.
- ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; DE CARVALHO, R. B. F.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, n. 0, p. 56-62, 2012.
- ARGOTTE-RAMOS, R.; RAMÍREZ-AVILA, G.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M. D. C.; OVILLA-MUÑOZ, M.; LANZ-MENDOZA, H.; RODRÍGUEZ, M. H.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; ALVAREZ, L. Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the Stem Bark of *Hintonia latiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1442-1444, 2006.
- ASIEDU-GYEKYE, I. J.; ANTWI, D. A.; AWORTWE, C.; N'GUESSAN, B. B.; NYARKO, A. K. Short-term administration of an aqueous extract of kalanchoe integra var. crenata (Andr.) Cuf leaves produces no major organ damage in Sprague-Dawley rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 891-896, 2014.
- AWANG, K.; CHAN, G.; LITAUDON, M.; ISMAIL, N. H.; MARTIN, M.-T.; GUERITTE, F. 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7873-7877, 2010.
- BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CÔRREA, A. G.; JÚNIOR, J. A.; DOS SANTOS, A. O.; CORTEZ, D. A. G. Structure–activity relationship of (–) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 651-658, 2008.
- BRENZAN, M. A.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CÔRREA, A. G.; JÚNIOR, J. A.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CORTEZ, D. A. G. Effects of (–) mammea A/BB isolated from *Calophyllum*

*brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3–4, p. 223-230, 2012.

CHAHAR, M. K.; SANJAYA KUMAR, D. S.; LOKESH, T.; MANOHARA, K. P. *In-vivo* antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 386-391, 2012.

CRISTIANS, S.; BYE, R.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 530-535, 2013.

CRISTIANS, S.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; PÉREZ-VÁSQUEZ, A.; PALACIOS-ESPINOSA, F.; CIANGHEROTTI, C.; BYE, R.; MATA, R. Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 408-413, 2009.

CRISTIANS, S.; MATA, R.; BYE, R. Phenological and geographical influence in the concentration of selected bioactive 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Hintonia latiflora* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 308-313, 2014.

CUNHA, M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. **Planta Med**, v. 82, n. 03, p. 190-194, 2016.

DANIS, O.; DEMIR, S.; GUNDUZ, C.; ALPARSLAN, M. M.; ALTUN, S.; YUCE-DURUN, B. Synthesis of selected 3- and 4-aryl coumarin derivatives and evaluation as potent antioxidants. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 6, p. 6061-6077, 2016.

DEL RAYO CAMACHO, M.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; SOLIS, P. N. In vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of Some Alkaloids, Quinones, Flavonoids, and Coumarins. **Planta Med**, v. 70, n. 01, p. 70-72, 2004.

DONNELLY, D. M. X.; SHERIDAN, M. H. Neoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids: Advances in Research since 1980**. Boston, MA: Springer US, 1988. p.211-232.

FREITAS, R.; DA SILVA, O. G.; DE FREITAS, R.; BARREIROS, A.; DAVID, J.; ALVES, C.; PINTO, C.; DAVID, J. *In Vitro* Effects of Arylhydrocoumarin on Free Radicals and Oxidative Stress in Erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 5, n. 11, p. 1069-1082, 2014.

FREITAS, R. M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 2, p. 140-144, 2009.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; KHILYA, V. P. Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 1, p. 54-121, 2003.

ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TAN, H. T. W.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. **Cancer Letters**, v. 169, n. 1, p. 15-19, 2001.

KUMAR, P.; KUSHWAHA, P.; KHEDGIKAR, V.; GAUTAM, J.; CHOUDHARY, D.; SINGH, D.; TRIVEDI, R.; MAURYA, R. Neoflavonoids as potential osteogenic agents from *Dalbergia sissoo* heartwood. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2664-2668, 2014.

LEITE, A. D. S.; DANTAS, A. F.; OLIVEIRA, G. L. D. S.; J, G.; NIOR, A. L.; DE LIMA, S. G.; ALO; CIT; GRA, N. M. D.; LOPES, A.; FREITAS, R. M.; MELO-CAVALCANTE, A. A.; DANTAS LOPES, J.; ARIMATEIA. Evaluation of Toxic, Cytotoxic, Mutagenic, and Antimutagenic Activities of Natural and Technical Cashew Nut Shell Liquids Using the *Allium cepa* and *Artemia salina* Bioassays. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 16, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MAJUMDER, P.; CHATTERJEE LAHIRI, S.; MUKHOTI, N. The reactions of phenols with  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aromatic acids in presence of polyphosphoric acid: synthetic and mechanistic studies. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 78, n. 10-12, p. 743-755, 2001.

MÁRQUEZ, N.; SANCHO, R.; BEDOYA, L. M.; ALCAMÍ, J.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; FELICIANO, A. S.; FIEBICH, B. L.; MUÑOZ, E. Mesuol, a natural occurring 4-phenylcoumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF- $\kappa$ B pathway. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2-3, p. 137-145, 2005.

OECD, Test No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method: Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing, 2001.

OECD, Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing, 2008.

PANDEY, R. P.; SOHNG, J. K. Genetics of Flavonoids. In: RAMAWAT, G. K. e MÉRILLON, J.-M. (Ed.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.1617-1645.

PIERSON, J.T.; DUMÈTRE, A.; HUTTER, S.; DELMAS, F.; LAGET, M.; FINET, J.P.; AZAS, N.; COMBES, S. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 864-869, 2010.



RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A. Chapter 50 - Hematopoietic System. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G., *et al* (Ed.). **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)**. Boston: Academic Press, 2013. p.1863-1933.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; VEGA-AVILA, E.; ABE, F.; KINJO, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 431-436, 2008.

SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físicoquímicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 742-750, 2013.

SILVA, A. P. D. S. C. L.; OLIVEIRA, G. L. S.; MEDEIROS, S. C.; SOUSA, A. M. L.; LOPES, L. D. S.; DAVID, J. M.; JUNIOR, J. S. D. C.; FREITAS, R. M. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p. 477-482, 2016.

SITNIKOV, N. S.; SINTSOV, A. V.; SHCHEGRAVINA, E. S.; PROKOP, A.; SCHMALZ, H. G.; FOKIN, V. V.; FEDOROV, A. Y. Synthesis and antitumor activity of 7-(triazol-1-yl)pyrroloalcolchicine derivatives. **Russian Chemical Bulletin**, v. 64, n. 6, p. 1362-1368, 2015.

VEROTTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, P. V.; NERI, M. G.; RAIMONDI, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2867-2879, 2004.

VESELINOVIĆ, J. B.; VESELINOVIĆ, A. M.; NIKOLIĆ, G. M.; PEŠIĆ, S. Z.; STOJANOVIĆ, D. B.; MATEJIĆ, J. S.; MIHAJILOV-KRSTEV, T. M. Antibacterial potential of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: integrated in vitro and molecular docking studies. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 4, p. 1626-1634, 2015.

ZHANG, K.; DING, W.; SUN, J.; ZHANG, B.; LU, F.; LAI, R.; ZOU, Y.; YEDID, G. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. **Biochimie**, v. 107, Part B, p. 203-210, 2014.

Atividade anti-helmíntica do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocumarina  
contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

## **6. CAPÍTULO III**

(Capítulo submetido à *New Journal of Chemistry*)

Qualis A2

## **Atividade anti-helmíntico 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni***

### **Resumo**

Dentre os grupos de substâncias de origem natural com promissora ação farmacológica contra as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), podem ser destacados os neoflavonoides e seus derivados que compreendem um grande grupo de compostos com estrutura química muito variada e que estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Neste contexto farmacológico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica do neoflavonoide 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina, em modelo experimental *in vitro*. O 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina sintetizado pela reação de condensação entre resorcinol e ácido cinâmico utilizando catálise ácida foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5%) nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, as quais foram usadas para avaliação anti-helmíntica contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Os experimentos realizados demonstraram atividade anti-helmíntica em relação aos parâmetros avaliados, uma vez que foi possível observar nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL) elevada taxa de mortalidade dos vermes *S. mansoni*, redução na atividade motora, mudanças na morfologia tegumentar e inibição na produção de ovos pela separação de todos os casais de vermes adultos tratados com o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina. A capacidade do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina de manter os vermes adultos machos e fêmeas separados demonstra ser a principal justificativa para elevada redução na oviposição de *S. mansoni*. Assim, estes resultados fornecem uma base inicial para estudos mais aprofundados do potencial antiprotozoário contra o *S. mansoni*, uma vez que foi realizada uma avaliação *in vitro* inicialmente da atividade esquistossomicida do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina.

**Palavras-chave:** Anti-helmíntica, 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina, neoflavonoide, *Schistosoma mansoni*.

## 1. Introdução

A esquistossomose está entre as principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), sendo a segunda doença parasitária mais importante no mundo em termos de impacto na saúde pública (COBO, 2014). Mesmo com o grande progresso em relação ao controle da morbidade e redução do número de pessoas infectadas nas últimas décadas, há ainda um número elevado de pessoas acometidas pela esquistossomose que está estimado em 240 milhões no mundo (OMS, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente, 700 milhões de pessoas estão atualmente em risco de desenvolver a esquistossomose por viverem em áreas endêmicas (OMS, 2016).

No Brasil, é estimado que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivam em áreas endêmica (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe e Minas Gerais) e estão com risco de infecção, sendo que 7 milhões estão infectadas, tornando o Brasil o país mais afetado por este tipo de doença nas Américas (OMS, 2012; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014; SCHOLTE et al., 2014; BARBOSA et al., 2016). Por afetar uma vasta extensão do território nacional, a esquistossomose ainda é considerada um problema de saúde pública no Brasil por acometer milhões de pessoas e por provocar um número expressivo de formas graves e óbitos. Segundo os recentes dados descrito por BARBOSA et al. (2016), os estados considerados historicamente endêmicos como Pernambuco (2578), Alagoas (1103), Minas Gerais (857) e Bahia (768) foram os que apresentaramos maiores números de óbitos por esquistossomose deste 1999 até 2013.

Apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de uma vacina para prevenir a esquistossomose humana, a quimioterapia está entre as principais medidas adotadas para a redução da incidência e prevalência desta doença no mundo (FENWICK; JOURDAN, 2016). O principal tratamento quimioterápico para a esquistossomose é realizado pelo uso de praziquantel (PZQ), um fármaco de baixo custo e eficaz contra algumas espécies do gênero *Schistosoma* que afeta o ser humano (CHAN; ZAROWIECKI; MARCHANT, 2013; LEE et al., 2014). No entanto, devido à dependência de uma única droga e, conseqüentemente, ao seu uso generalizado deste de 1970 em nível mundial, algumas espécies do gênero *Schistosoma* estão desenvolvendo tolerância e resistência contra o PZQ, o que pode resultar em baixas taxas de cura (HUYSE et al., 2013).

Desta forma, é uma situação bastante preocupante ter apenas um agente quimioterápico para o tratamento da esquistossomose e, por isso, existe a necessidade para o desenvolvimento de novos agentes antischistosoma. Neste sentido, vários grupos de pesquisas

têm testado uma série de novas moléculas de origem natural, sintética ou semissintética para o desenvolvimento de novos agentes com potencial antischistosomatais como acetato de carvacrolila (MORAES et al., 2013a), fitol (MORAES et al., 2014), piplartina (MORAES et al., 2012), epóxi-limoneno (MORAES et al., 2013b), plumbagina (LORSUWANNARAT et al., 2013), mefloquina (HOLTFRETER et al., 2011), compostos tioxo-imidazolidinas (NEVES et al., 2011), derivados de pirrolo-[1,2,5]benzotiazepinas (CHEN et al., 2013) e derivado sintéticos do PZQ (SADHU et al., 2012; GUGLIELMO et al., 2014; ZHENG et al., 2014).

Portanto, o desenvolvimento de novas pesquisas com o objetivo de analisar compostos para o tratamento da esquistossomose é altamente necessário. Dentre os grupos de substâncias de origem natural com promissora ação farmacológica contra asDTNs, podem ser destacados os neoflavonoides e seus derivados que compreendem um grande grupo de compostos com estrutura química muito variada e que estão amplamente distribuídos no reino vegetal (GARAZD; GARAZD; KHILYA, 2003). Aos neoflavonoides têm sido atribuído potencial farmacológico como antimalárico (ARGOTTE-RAMOS et al., 2006), antibacteriano (PIERSON et al., 2010), antileishmania (BRENZAN et al., 2008; BRENZAN et al., 2012) e antitripanossomose (DEL RAYO CAMACHO et al., 2004; REYES et al., 2008).

Neste contexto farmacológico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade esquistomicida do composto sintético 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina, classificado atualmente como neoflavonoide, em um modelo experimental *in vitro*. Desta forma, e considerando o seu potencial antiprotozoário, o presente trabalho pretendeu ampliar o campo de aplicabilidade farmacológica do neoflavonoide 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina contra o parasita protozoário *Schistosoma mansoni*.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Reagentes químicos e instrumentos**

Para as colunas cromatográficas (CC) e para as CCDC em placas foram utilizadas sílica gel 60 (200 - 400 *mesh*, Acros) e sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Sigma), respectivamente. Os dados de RMN foram registrados em espectrômetro *Varianmod. Gemini 2000* operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C,  $\delta$  em ppm e foi utilizado como referência interna o TMS ou resíduo do solvente não deuterado. Os espectros obtidos na região do infravermelho foram obtidos por meio de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) usando o equipamento modelo *IRAffinity-1* da *Shimadzu*. As amostras foram preparadas na forma de

filme líquido sobre pastilha de brometo de potássio (KBr) ou na forma sólida dispersa em KBr anidro.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro CGMS-QP2010 da Shimadzu®, através de injeção direta, ionização por impacto de elétrons (70 eV), com fonte de íons a 300 °C e com variação da temperatura de 80–340 °C a 20 °C/minutos. Os pontos de fusão foram determinados no equipamento da Microquímica e não foram corrigidos. Todos os reagentes utilizados foram de qualidade P.A e obtidos da Merck® ou Acros Organics®.

## 2.2. Síntese do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina

O ácido polifosfórico foi preparado seguindo os procedimentos descritos por Majumder, Chatterjee e Mukhoti (2001). Assim, foram adicionados em um balão de 50 mL, 12,5 gramas de anidrido fosfórico (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 20 mL de ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (D = 1,75 g/mL). A mistura formada foi aquecida a 100 °C sob agitação vigorosa pelo tempo de 3 horas. Após este tempo, foi desligado o aquecimento e agitação, sendo que o sistema foi mantido em repouso até atingir temperatura ambiente para obtenção de uma mistura viscosa de cor cristalina.

Em um balão de fundo redondo contendo 20 mL de ácido polifosfórico, à temperatura ambiente, foram adicionados 9,09 mmol de ácido cinâmico e 9,09 mmol de resorcinol. A mistura foi aquecida à temperatura de 80 °C, sob agitação, por três horas. Em seguida o meio reacional foi tratado com água gelada e a mistura extraída com clorofórmio (3 x 20 mL). A fase orgânica foi separada, tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido à coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60 tipo “flash” usando CHCl<sub>3</sub> como eluente, para fornecer o composto 4-aril-7-hidroxi-3,4-di-hidrocumarina com 69% de rendimento.

A acetilação da 4-aril-7-hidroxi-3,4-di-hidrocumarina foi realizada partindo-se de 500 mg (2,08 mmol) dessa substância e adição de anidrido acético (1,1 equiv.), piridina (2 equiv.), em presença de quantidades catalíticas de dimetilaminopiridina (DMAP), sob agitação constante e mantendo-se a mistura à temperatura ambiente por 12 horas. A reação foi acompanhada por CCDC, que evidenciou a formação de um único produto. Em seguida, foi vertido água gelada no meio reacional, e a mistura extraída com CHCl<sub>3</sub> (3 x 20 mL). A fase orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado usando-se coluna “flash” eluindo com CHCl<sub>3</sub> para fornecer o neoflavonoide 7-Acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocumarina com rendimentos de 81%.

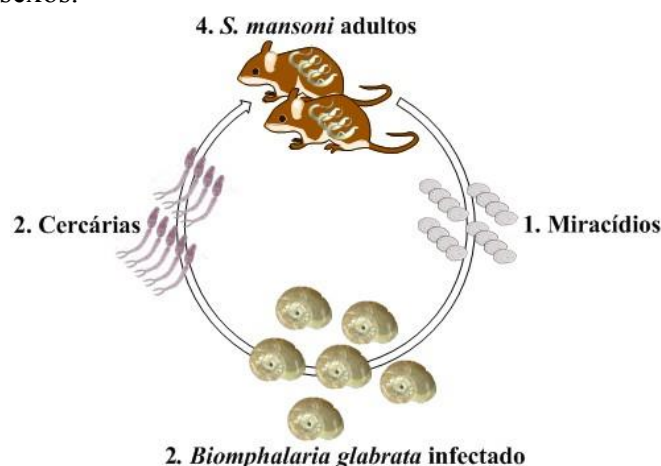
O neoflavonoide 4-aril-7-hidroxi-3,4-di-hidrocurmarina foi obtido na forma de sólido branco com PF (°C) 137-139 (141-142). EMIE (70 eV)  $m/z$  (%):240 ( $M^+$ , 85), 222 (12), 212 (22), 197 (100), 163 (6), 91 (5),77 (12), 63 (6). IV (KBr):3460,3026, 2908, 1735, 1508, 1452, 1277, 1141, 1030. RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ , (ppm)]: 9,81 (*sl*, OH), 7,15-7,50 (*m*, H-2'-H-6'), 6,82 (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-5), 6,55 (*d*,  $J = 7,8$  Hz, H-6), 6,63 (*sl*, H-8), 4,36 (*t*,  $J = 7,2$  Hz, H-4), 3,10 (*dd*,  $J = 7,2$  e 13,2 Hz, H-3a e H-3b). RMN de  $^{13}C$  [75 MHz,  $CDCl_3$ , (ppm)]: 167,9 (C-2), 157,7 (C-7), 153,0 (C-9), 141,9 (C-1'), 120,9 (C-5), 128,6 (C2', C-6'), 127,2 (C-3', C-5'), 127,1 (C-4'), 116,1 (C-10), 111,8 (C-6), 109,5 (C-8), 38,6 (C-4), 36,7 (C-3).

O 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarinafoi obtido na forma desólido branco com PF (°C) 84-86 (85-86). EMIE (70 eV)  $m/z$  (%):282 ( $M^+$ , 12), 240 (100), 222 (45), 212 (15), 197 (83), 163 (6), 115 (23), 100 (13), 91 (5),77 (12). IV (KBr):3050, 3026, 2908, 2850, 1750, 1738, 1568, 1520, 1452, 1350, 1152, 1135, 1036.

### 2.3. Animais e ciclo de vida de *S. mansoni*

Para obtenção dos parasitas, o ciclo de vida do helminto *S. mansoni* (linhagem BH) foi mantido em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) e em hamsters *Mesocricetus auratus* (hospedeiro definitivo) (**Figura 1**)(MORAES, 2012; SILVA et al., 2015). Após 49 dias de infecção, os hamsters infectados com 150 cercárias foram sacrificados e os vermes adultos de *S. mansoni* de ambos os sexos foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute, Invitrogen*) com heparina sódica (SMITHERS; TERRY, 1965). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEAA/UFPI # 013/11)

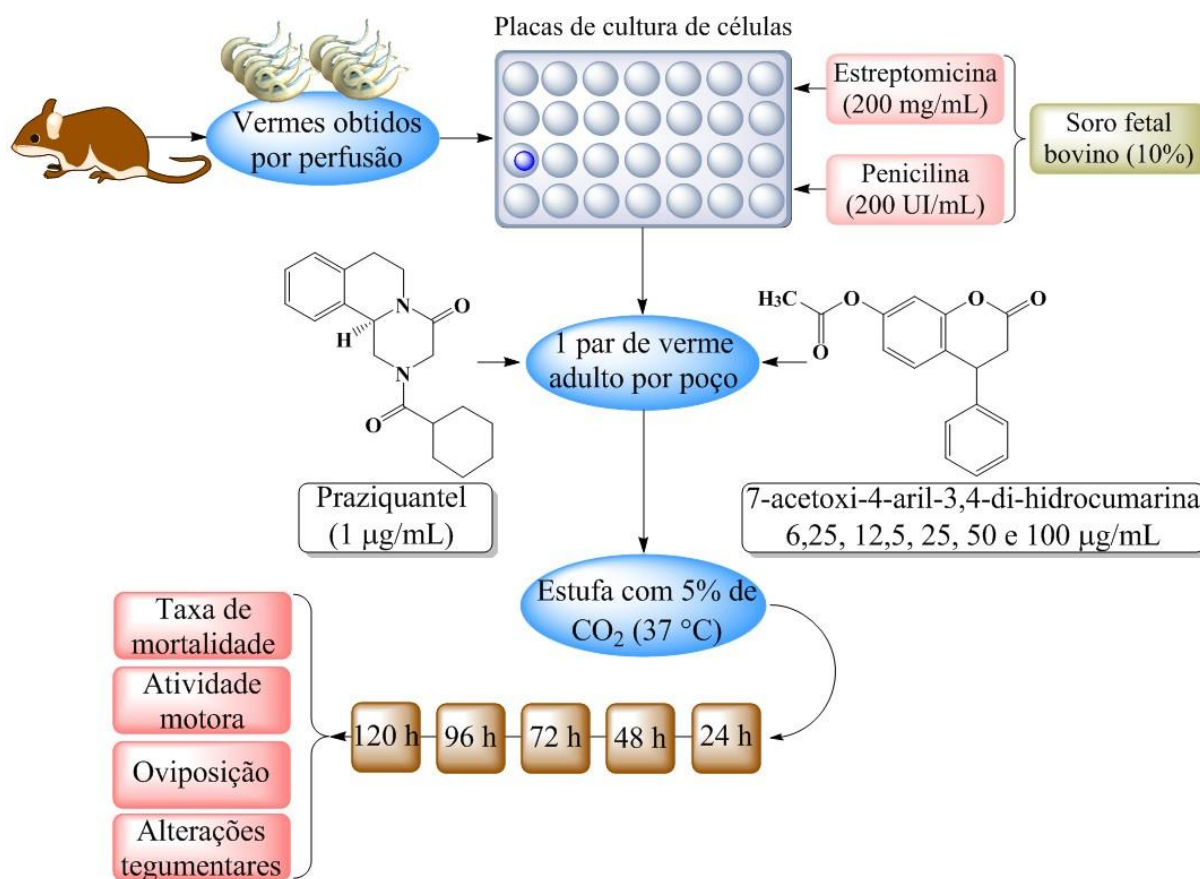
**Figura 1:** Desenvolvimento do ciclo de vida do helminto *S. mansoni* para obtenção de vermes adultos de ambos os sexos.



## 2.4. Avaliação da atividade anti-helmíntica em *S. mansoni*

Parasitas de *S. mansoni* adultos foram cultivados em meio RPMI 1640 (pH7,5) contendo 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (200 µg/mL) e penicilina (200 UI/mL) (*Invitrogen*). Em seguida, os parasitas foram distribuídos em placas de cultura de células com 24 poços (*Techno PlasticProducts*, TPP, St. Louis, MO, USA) contendo 2 mL do meio RPMI 1640 e mantidos em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37 °C (**Figura 2**). Os parasitas foram constantemente monitorados durante 72 horas. O 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO 0.5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, as quais foram usadas para avaliação antiesquistossomal em placas de culturas com um volume final de 2 mL (RPMI 1640). Simultaneamente, foi preparado um controle negativo com DMSO 0,5% em meio RPMI 1640 e um controle positivo com o PZQ (praziquantel) na concentração de 1 µg/mL. Todo o procedimento experimental representado na **Figura 2** foi realizado em triplicata.

**Figura 2:** Procedimento da avaliação experimental das propriedades anti-helmíntica do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocoumarina.





Usando um microscópio invertido, os parâmetros da atividade anti-helmíntica avaliados foram ataxa de mortalidade, a redução na atividade motora (leve ou significativa), as alterações tegumentares e a capacidade reprodutiva (oviposição) pelos vermes *S. mansoni* durante o tratamento *in vitro* nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Neste estudo, um verme de *S. mansoni* foi considerado morto na ausência de movimento por 1 minuto (MORAES, 2012; MORAES et al., 2014; SILVA et al., 2015).

### **2.5. Avaliação morfológica do tegumento de *S. mansoni* adulto**

Uma análise ultraestrutural de alterações morfológicas no tegumento de parasitas adultos de *S. mansoni* foi realizado utilizando microscopia confocal a laser (MORAES et al., 2012; MORAES et al., 2014). Resumidamente, após o período de 72 horas de tratamento com o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarinas concentrações de 50 e 100 µg/mL, os vermes de *S. mansoni* foram fixados em solução de FAA (água destilada, etanol, ácido acético e formaldeído) e analisados em um microscópio confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Standorf Gottingen, Vertrieb, Germany) com excitação de 488 nm e emissão de 505 nm.

### **2.6. Avaliação da capacidade reprodutiva de *S. mansoni* adulto**

O presente estudo através da contagem dos números de ovos produzidos na presença do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarinas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 µg/mL, avaliou a capacidade reprodutiva dos vermes adultos de *S. mansoni* (MORAES et al., 2011a; MORAES et al., 2011b; VERAS et al., 2012). Durante o tratamento com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina, a produção de ovos foi monitorada nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

### **2.7. Análise estatística**

Os dados numéricos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism 6.02* (San Diego, CA, USA) através da análise de variância *one way* seguida de *Newman-Keuls* como *post hoc* teste para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeito do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarinasobre *S. mansoni*

Os resultados dos estudos com *S. mansoni* adulto de 49 dias de idade exposto ao 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e dos grupos controle estão demonstrados na **Tabela 1 (p. 101)**. Quando os vermes de *S. mansoni* foram mantidos em meio RPMI 1640 contendo apenas DMSO 0,5%, não foram observadas alterações nos parâmetros avaliados e 100% dos vermes permaneceram vivos no intervalo de 72 horas. Ao contrário do observado no DMSO 0,5%, os vermes de *S. mansoni* expostos ao controle positivo PZQ (1 µg/mL) exibiram fortes contrações espasmódicas apresentando 100% de redução da atividade motora do corpo. Além disso, todos os parasitas de ambos os sexos morreram em 24 horas de tratamento (**Tabela 1, p. 101**).

O 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina adicionado ao meio RPMI 1640 proporcionou uma significativa redução da atividade motora dos vermes de *S. mansoni* de ambos os sexos (**Tabela 1, p. 101**). Quando os vermes de *S. mansoni* adultos foram incubados com 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina na concentração de 6,25 µg/mL, não foi observada nenhuma interferência na atividade motora no intervalo de 72 horas. Por outro lado, quando os vermes de *S. mansoni* foram expostos ao 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, foi observada uma significativa redução da atividade motora no intervalo de 72 horas. Apenas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina causou a morte de 100% dos parasitas adultos de ambos os sexos a partir do intervalo de 48 horas de tratamento (**Tabela 1, p. 101**).

**Tabela 1:** Efeitos *in vitro* do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina contra *S. mansoni* adulto de 49 dias.

| Grupo                 | Período de incubação (h) | Vermes separados (%) <sup>a</sup> | Mortalidade (%) <sup>a</sup> |     | Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup> |   |              |     |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----|--|---|--------------|-----|
|                       |                          |                                   | M                            | F   | Leve   |   | Significante |     |
|                       |                          |                                   |                              |     | M  | F | M            | F   |
| Controle <sup>b</sup> | 24                       | 0                                 | 0                            | 0   | 0  | 0 | 0            | 0   |
|                       | 48                       | 0                                 | 0                            | 0   | 0  | 0 | 0            | 0   |
|                       | 72                       | 0                                 | 0                            | 0   | 0  | 0 | 0            | 0   |
| PZQ <sup>c</sup>      | 24                       | 0                                 | 100                          | 100 | 0  | 0 | 100          | 100 |
|                       | 48                       | 0                                 | 100                          | 100 | 0  | 0 | 100          | 100 |
|                       | 72                       | 0                                 | 100                          | 100 | 0  | 0 | 100          | 100 |
| 100 µg/mL             | 24                       | 100                               | 100                          | 100 | 0  | 0 | 100          | 100 |

|            |    |     |     |     |    |   |     |     |
|------------|----|-----|-----|-----|----|---|-----|-----|
|            | 48 | 100 | 100 | 100 | 0  | 0 | 100 | 100 |
|            | 72 | 100 | 30  | 0   | 60 | 0 | 10  | 0   |
| 50 µg/mL   | 24 | 100 | 100 | 60  | 0  | 0 | 100 | 100 |
|            | 48 | 100 | 100 | 100 | 0  | 0 | 100 | 100 |
|            | 72 | 100 | 100 | 100 | 0  | 0 | 100 | 100 |
| 25 µg/mL   | 24 | 100 | 10  | 0   | 20 | 0 | 10  | 0   |
|            | 48 | 100 | 30  | 0   | 70 | 0 | 30  | 0   |
|            | 72 | 100 | 50  | 0   | 50 | 0 | 50  | 0   |
| 12.5 µg/mL | 24 | 100 | 0   | 0   | 0  | 0 | 0   | 0   |
|            | 48 | 100 | 0   | 0   | 0  | 0 | 0   | 0   |
|            | 72 | 100 | 10  | 0   | 70 | 0 | 10  | 0   |
| 6.25 µg/mL | 24 | 100 | 0   | 0   | 0  | 0 | 0   | 0   |
|            | 48 | 100 | 0   | 0   | 0  | 0 | 0   | 0   |
|            | 72 | 100 | 0   | 0   | 0  | 0 | 0   | 0   |

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes investigado.

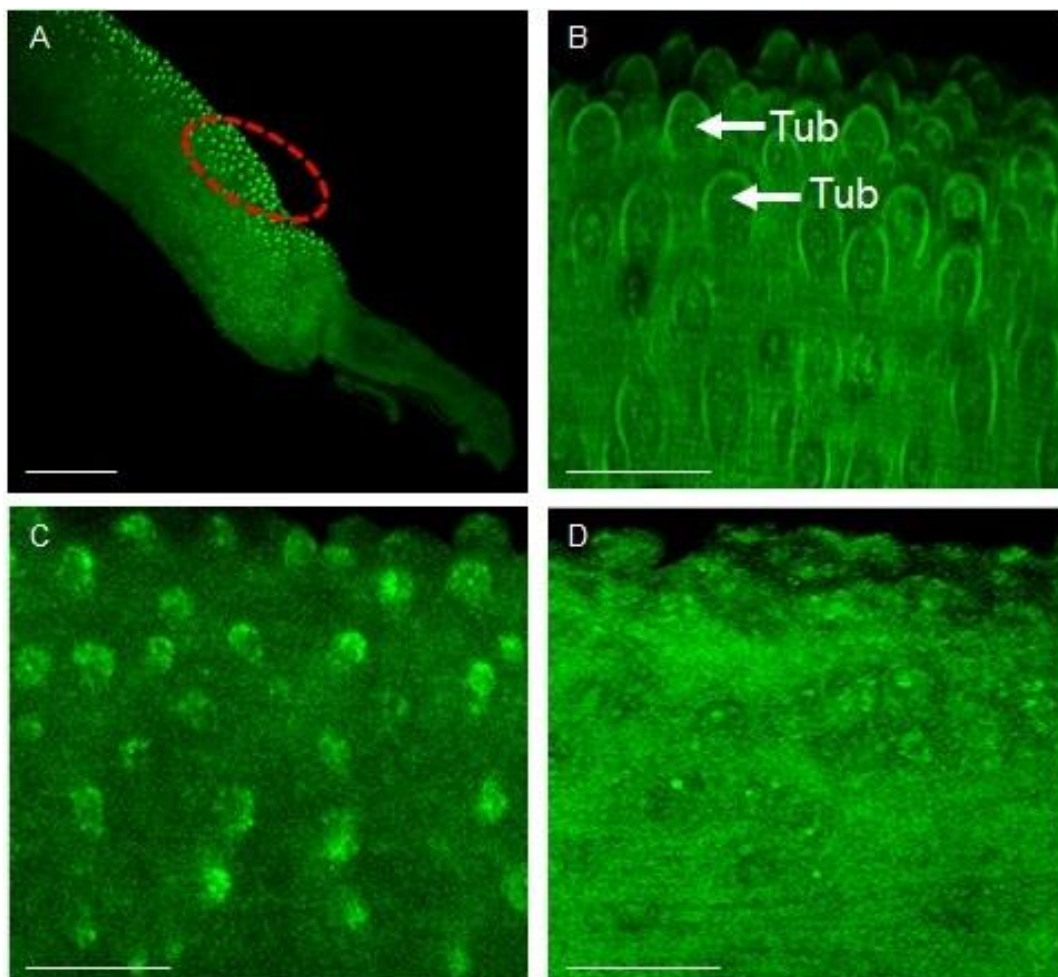
<sup>b</sup> DMSO 0,5%.

<sup>c</sup> Testado na concentração de 1µg/mL.

### 3.2. Efeito do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina sobre o tegumento de *S. mansoni*

Para verificar o efeito do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina no tegumento de *S. mansoni*, foi realizada uma análise por microscopia confocal a laser. Nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, alterações morfológicas foram detectadas na superfície de vermes *S. mansoni* machos com extensa interrupção tegumentar como descamação e desintegração de tubérculos, o que resultou em zonas lisas no tegumento dos vermes (**Figura 3C e 3D**). Estas alterações morfológicas induzidas pelo 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurmarina foram dependentes das concentrações utilizadas e nenhuma alteração morfológica foi observada nos parasitas pertencentes ao grupo do controle negativo no intervalo de 72 horas (**Figura 3A e 3B**).

**Figura 3:** Alterações tegumentares ocasionadas pelo 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurarina na região dorsal de *S. mansoni* machos.

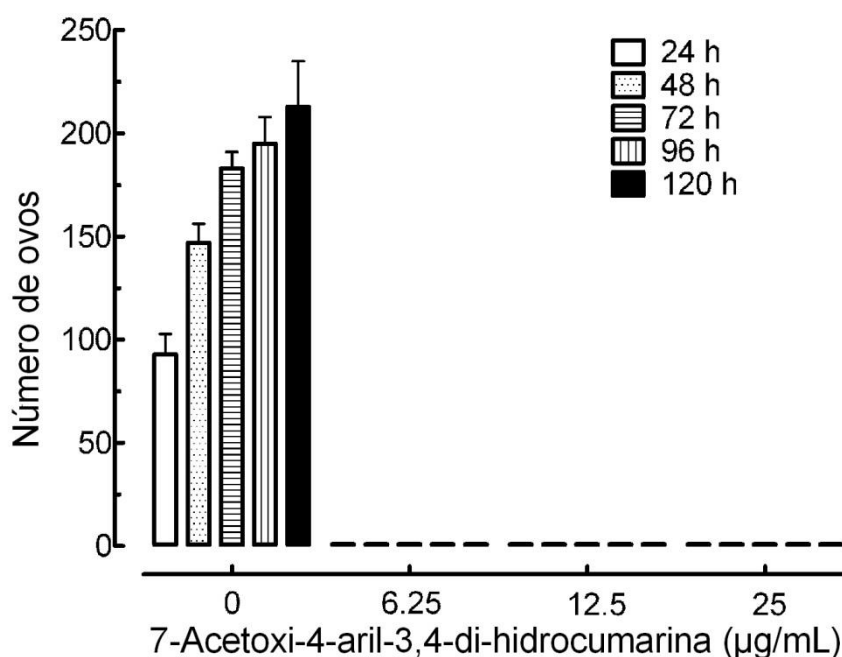


Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurarina em diferentes concentrações. Após 72 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução FAA (água destilada, etanol, ácido acético e formaldeído) e as imagens fluorescentes obtidas em microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss). **A:** Morfologia geral mostrando a região dorsal de *S. mansoni* adulto. **B:** controle, sem adição do 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidrocurarina. **C:** 50 µg/mL. **D:** 100 µg/mL. **A-D:** Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barra da escala = 50 µm. Tubérculos (Tub).

### 3.3. Efeito do 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina sobre a capacidade reprodutiva de *S. mansoni*

A partir do monitoramento dos vermes adultos de *S. mansoni* acasalados nas concentrações subletais, foi possível constatar que o 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina atua sobre a capacidade reprodutiva dos parasitas (**Tabela 1, p. 101, eFigura 4**). Comparado com o grupo controle incubado apenas em meio de cultura RPMI, o número de ovos foi reduzido em 100% nas concentrações 6,25, 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  do 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina. É importante destacar que a incubação de vermes adultos de *S. mansoni* com o 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina manteve os vermes machos e fêmeas separados (**Tabela 1, p. 101**) a partir de 24 horas de incubação, o que impediu o processo de acasalamento e oviposição.

**Figura 4:** Efeito do 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina na oviposição de fêmeas de *S. mansoni*.



Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo o 7-acetoxi-4-iril-3,4-di-hidrocurarina em diferentes concentrações. As contagens de ovos foram realizadas diariamente, nos tempos indicados, antes da separação dos casais de vermes ou da ação helmíntica. Os valores são médias de dez casais adultos acasalados. Os valores são as médias  $\pm$  EPM de dez pares de vermes.

#### 4. Discussão

O surgimento de parasitas resistentes ao PZQ, o principal quimioterápico para o tratamento da esquistossomose em ser humano no mundo, tem levantado preocupações de projetos como o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde, na qual tem incentivado a descoberta e desenvolvimento de novos compostos esquistossomicidas (LUSTIGMAN et al., 2012; ROLLINSON et al., 2013).

Com relação às DTNs, os neoflavonoides têm atraído grande interesse nos últimos anos devido às suas propriedades antiparasitária em estudos *in vitro* e *in vivo*, na qual, é atribuída ao padrão de substituição encontrado em sua estrutura química básica (OLIVEIRA et al., 2016). Dentre os estudos antiparasitária desenvolvidos para os neoflavonoides, vários demonstraram atividade contra o *Plasmodium falciparum* sensível a cloroquina D10 (CQ-S) e resistente a cloroquina W2 (CQ-R) (KÖHLER et al., 2001; VEROTTA et al., 2004), *Leishmania donovani* (PIERSON et al., 2010), *L. amazonenses* (BRENZAN et al., 2007; BRENZAN et al., 2008; BRENZAN et al., 2012) e *Trypanosoma cruzi* (REYES et al., 2008). Desta forma, a realização de novas pesquisas como a síntese de neoflavonoides pode propiciar o desenvolvimento de novas moléculas bioativas contra as DTNs.

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos anti-helmíntica do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocumarina e como abordado na introdução, o desenvolvimento de pesquisas com vários tipos de compostos tem sido uma das principais estratégias na busca de novos agentes antiesquistossomose. O composto avaliado no presente trabalho é do grupo dos neoflavonoides e como observado nos resultados obtidos, o 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocumarina apresenta atividade esquistomicida contra o parasita *S. mansoni*. Os experimentos *in vitro* mostraram resultados anti-helmíntica em relação aos parâmetros avaliados, uma vez que foi possível observar nas concentrações testadas elevada taxa de mortalidade dos vermes *S. mansoni*, redução na atividade motora, mudanças na morfologia tegumentar e inibição na produção de ovos pela separação de todos os casais de vermes adultos.

Em relação à capacidade reprodutiva de vermes *S. mansoni*, foi observada a redução de 100% no número de ovos nas concentrações subletais (6,25, 12,5 e 25 µg/mL) após 24 horas de incubação quando comparado com o grupo controle negativo. A capacidade do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocumarina de manter os vermes adultos machos e fêmeas separados demonstra ser a principal justificativa para elevada redução na oviposição de *S. mansoni*. Esta ação esquistossomicida pode potencializar as propriedades apresentada pelo 7-acetoxi-4-aryl-

3,4-di-hidrocurmarina neste estudo, uma vez que as manifestações clínicas da esquistossomose estão relacionadas com a presença de ovos nos tecidos do hospedeiro, principalmente o fígado (MAGUIRE, 2015; FREZZA et al., 2015; TOFFOLI et al., 2016). Segundo ALENCAR et al. (2016), a interferência na capacidade reprodutiva de vermes *S. mansoni* pode estar associado com alterações morfológicas no sistema de reprodução (lóbulo testicular, glândulas vitelinas e ovário) dos vermes quando expostos ao composto com propriedades antischistosoma.

Na análise morfológica, os resultados obtidos revelaram alterações tegumentares acentuadas após incubação de vermes adultos de *S. mansoni* com o 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocurmarina quando comparado com o controle negativo. Desta forma, é demonstrando que o tegumento muscular de vermes *S. mansoni* pode ser um alvo principal para as propriedades esquistossomicida do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocurmarina como redução na atividade motora. Como abordado por outros estudos realizados recentemente (GUIMARÃES et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015; ALENCAR et al., 2016), danos ao tegumento de *S. mansoni* tem sido considerado o principal alvo de compostos antischistosomopromissores, tendo em vista que, a integridade do tegumento é importante para a sobrevivência e proliferação do parasita.

Os parâmetros investigados no presente estudo demonstram claramente a atividade esquistossomicida do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocurmarina, mas o possível mecanismo biológico de ação ainda continua desconhecido, o que indica a necessidade de futuros estudos. Além disto, é necessária a realização de estudos *in vivo* em animais infectados por *S. mansoni* para confirmar a sua ação esquistossomicida.

## 5. Conclusão

O presente trabalho constatou atividade esquistossomicida *in vitro* do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocurmarina por meio de observações nos parâmetros de mortalidade, redução na atividade motora, número de ovos e alterações tegumentares de vermes adultos de *S. mansoni*. Assim, estes resultados fornecem uma base inicial para estudos mais aprofundados contra o *S. mansoni*, uma vez que foi realizada uma avaliação *in vitro* inicialmente da atividade esquistossomicida do 7-acetoxi-4-aryl-3,4-di-hidrocurmarina.

## Referências

- ALENCAR, A. C. M. D. B.; SANTOS, T. D. S.; NEVES, R. H.; LOPES TORRES, E. J.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; MACHADO-SILVA, J. R. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult *Schistosoma mansoni* in hypercholesterolemic mice. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 115-123, 2016.
- ARGOTTE-RAMOS, R.; RAMÍREZ-AVILA, G.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M. D. C.; OVILLA-MUÑOZ, M.; LANZ-MENDOZA, H.; RODRÍGUEZ, M. H.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; ALVAREZ, L. Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the StemBark of *Hintonia latiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1442-1444, 2006.
- BARBOSA, C. S.; DE SOUZA GOMES, E. C.; CAMPOS, J. V.; DE OLIVEIRA, F. J. M.; DA SILVA MESQUITA, M. C.; DE OLIVEIRA, E. C. A.; DOMINGUES, A. L. C. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta Tropica**, *In press*, 2016.
- BRENZAN, M.; NAKAMURA, C.; PRADO DIAS FILHO, B.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.
- BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.M.; CÔRREA, A.G.; JÚNIOR, J.A.; DOS SANTOS, A.O.; CORTEZ, D.A.G. Structure–activity relationship of (–) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 651-658, 2008.
- BRENZAN, M. A.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CÔRREA, A. G.; JÚNIOR, J. A.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CORTEZ, D. A. G. Effects of (–) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3–4, p. 223-230, 2012.
- CHAN, J. D.; ZAROWIECKI, M.; MARCHANT, J. S. Ca<sup>2+</sup> channels and praziquantel: A view from the free world. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 619-628, 2013.
- CHEN, J.; SUN, W.; YANG, J.; SUN, H.; WANG, Z.; DONG, L.; QIAO, C.; XIA, C. Development of a novel class of pyrrolo-[1,2,5]benzothiadiazepine derivatives as potential anti-schistosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 13, p. 3785-3787, 2013.
- COBO, F. 8 - Schistosomiasis (bilharziasis). In: (Ed.). **Imported Infectious Diseases**: Woodhead Publishing, 2014. p.115-126.
- DEL RAYO CAMACHO, M.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; YARDLEY, V.; SOLIS, P.N. In vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of Some Alkaloids, Quinones, Flavonoids, and Coumarins. **Planta Med**, v. 70, n. 01, p. 70-72, 2004.
- FENWICK, A.; JOURDAN, P. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 385-388, 2016.



FREZZA, T. F.; DE SOUZA, A. L. R.; RIBEIRO PRADO, C. C.; DE OLIVEIRA, C. N. F.; GREMIÃO, M. P. D.; GIORGIO, S.; DOLDER, M. A. H.; JOAZEIRO, P. P.; ALLEGRETTI, S. M. Effectiveness of hyperbaric oxygen for experimental treatment of schistosomiasis mansoni using praziquantel-free and encapsulated into liposomes: Assay in adult worms and oviposition. **Acta Tropica**, v. 150, p. 182-189, 2015.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; KHILYA, V. P. Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 1, p. 54-121, 2003.

GUGLIELMO, S.; CORTESE, D.; VOTTERO, F.; ROLANDO, B.; KOMMER, V. P.; WILLIAMS, D. L.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. New praziquantel derivatives containing NO-donor furoxans and related furazans as active agents against *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 135-145, 2014.

GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D. M.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS, S. A. S.; PINTO, P. L. S.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; DE MORAES, J.; LOLI, A.; VERBI, T.; LEITE, J. R. S. A. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003656, 2015.

HOLTFRETER, M.C.; LOEBERMANN, M.; KLAMMT, S.; SOMBETZKI, M.; BODAMMER, P.; RIEBOLD, D.; KINZELBACH, R.; REISINGER, E.C. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 270-276, 2011.

HUYSE, T.; VAN DEN BROECK, F.; JOMBART, T.; WEBSTER, B.L.; DIAW, O.; VOLCKAERT, F.A.M.; BALLOUX, F.; ROLLINSON, D.; POLMAN, K. Regular treatments of praziquantel do not impact on the genetic make-up of *Schistosoma mansoni* in Northern Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 100-105, 2013.

KÖHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; GONZÁLEZ, J. C.; A, M.; HERNÁNDEZ, R.; IBARRA, W. A.; BERENDSOHN, U. G.; BIENZLE, E.; EICH. In vitro Antiplasmodial Activity of 4-Phenylcoumarins from *Exostemamexicanum*. **Planta Med**, v. 67, n. 01, p. 89-91, 2001.

LEE, E. F.; YOUNG, N. D.; LIM, N. T. Y.; GASSER, R. B.; FAIRLIE, W. D. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 75-84, 2014.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTA, P.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 18-27, 2013.

LUSTIGMAN, S.; PRICHARD, R.K.; GAZZINELLI, A.; GRANT, W.N.; BOATIN, B.A.; MCCARTHY, J.S.; BASÁÑEZ, M.G. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1582, 2012.

MAGUIRE, J. H. 290 - Trematodes (Schistosomes and Liver, Intestinal, and Lung Flukes) A2 - Bennett, John E. In: DOLIN, R. e BLASER, M. J. (Ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's**

**Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition).** Philadelphia: Content Repository Only!, 2015. p.3216-3226.e3.

MAJUMDER, P. L.; CHATTERJEE, S.; MUKHOTI, N. The reactions of phenols with  $\alpha,\beta$ -unsaturated aromatic acids in presence of polyphosphoric acid: synthetic and mechanistic studies. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 78, p. 743-755, 2001.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the in vitro Activity of Dermaseptin 01, a Cationic Antimicrobial Peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 548-558, 2011a.

MORAES, J.D.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P.O.M.V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011b.

MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. **Current Topics in Tropical Medicine, Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed.), ISBN**, p. 978-953, 2012.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L.F.; KATO, M.J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012.

MORAES, J.; CARVALHO, A.L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A.; MARQUES, T.D.; ANDRADE, L.; FREITAS, R.; SOUSA, D. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013a.

MORAES, J.; ALMEIDA, A.A.C.; BRITO, M.R.M.; MARQUES, T.H.C.; LIMA, T.C.; DE SOUSA, D.P.; NAKANO, E.; MENDONÇA, R.Z.; FREITAS, R.M. Anthelmintic Activity of the Natural Compound (+)-Limonene Epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Med**, v. 79, n. 03, p. 253-258, 2013b.

MORAES, J.; OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.G.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALLEGRETTI, S.M.; PINTO, P.L.S. Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2617, 2014.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of *Schistosoma mansoni*: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

NEVES, J.K.A.L.; DE LIMA, M.D.C.A.; PEREIRA, V.R.A.; DE MELO, C.M.L.; PEIXOTO, C.A.; PITTA, I.D.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; GALDINO, S.L. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 82-90, 2011.

OLIVEIRA, G. L. D. S.; DE MORAES, J.; SALDANHA, G. B.; FREITAS, R. L. M.; DAVID, J. P. D. L.; FREITAS, R. M. NEOFLAVONOIDS WITH IMPLICATIONS IN NEGLECTED DISEASES: AN TECNOLOGICA FORECASTING. **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 3, p. 1-14, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Weekly Epidemiological Record*, v. 87, n. 4, p. 37–44, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em 31 de julho. 2016.

PEREIRA, A. C.; SILVA, M. L. A. E.; SOUZA, J. M.; LAURENTIZ, R. S. D.; RODRIGUES, V.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; TAVARES, D. C.; FILHO, A. A. D. S.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; MAGALHÃES, L. G. In vitro and in vivo anthelmintic activity of (–)-6,6'-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, v. 149, p. 195-201, 2015.

PIERSON, J.T., DUMÈTRE, A., HUTTER, S., DELMAS, F., LAGET, M., FINET, J.P., AZAS, N., COMBES, S. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 864-869, 2010.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; VEGA-AVILA, E.; ABE, F.; KINJO, J.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mamea-type coumarins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 431-436, 2008.

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J.R.; TCHUENTÉ, L.A.T.; GARBA, A.; MOHAMMED, K.A.; SCHUR, N.; PERSON, B.; COLLEY, D.G.; UTZINGER, J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Tropica*, v. 128, n. 2, p. 423-430, 2013.

SADHU, P.S.; KUMAR, S.N.; CHANDRASEKHARAM, M.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; RAO, V.J. Synthesis of new praziquantel analogues: Potential candidates for the treatment of schistosomiasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 2, p. 1103-1106, 2012.

SCHOLTE, R.G.C.; GOSONI, L.; MALONE, J.B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica*, v. 132, p. 57-63, 2014.

SILVA, A. P.; SILVA, M. P.; OLIVEIRA, C. G.; MONTEIRO, D. C.; PINTO, P. L.; MENDONÇA, R. Z.; COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; DE MORAES, J. Garcinielliptone FC: Antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Toxicology in Vitro*, v. 29, n. 4, p. 681-687, 2015.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology*, v. 55, p. 695-700, 1965.

TOFFOLI DA SILVA, G.; ESPÍNDOLA, M. S.; FONTANARI, C.; ROSADA, R. S.; FACCIOLI, L. H.; RAMOS, S. G.; RODRIGUES, V.; FRANTZ, F. G. 5-lipoxygenase pathway is essential for the control of granuloma extension induced by *Schistosoma mansoni* eggs in lung. *Experimental Parasitology*, v. 167, p. 124-129, 2016.

VERAS, L.M.; GUIMARAES, M.A.; CAMPELO, Y.D.; VIEIRA, M.M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D.F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S.S.; BATISTA,

M.C.; LEITE, J.R.; MORAES, J. Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VEROTTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, P. V.; NERI, M. G.; RAIMONDI, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2867-2879, 2004.

ZHENG, Y.; DONG, L.; HU, C.; ZHAO, B.; YANG, C.; XIA, C.; SUN, D. Development of chiral praziquantel analogues as potential drug candidates with activity to juvenile *Schistosoma japonicum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4223-4226, 2014.

**BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO  
PARA TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi demonstrado que o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina apresenta atividade antiprotozoário *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni* pela indução de mortalidade, redução da atividade motora, alterações morfológicas na superfície tegumentar (descamação e desintegração de tubérculos) e inibição da oviposição (separação de todos os casais de vermes adultos). Os resultados obtidos demonstraram também que o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina não é tóxico quando administrado por via oralna dose de 300 e 2000 mg/kg em camundongos *Swiss* fêmeas. Desta forma, segundo o Sistema globalmente harmonizado de classificação (GHS) da diretriz 423 da OECD, o 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina abrange a categoria 5 dos compostos em que a toxicidade é superior a 2000 mg/kg de peso corporal. Assim como observado no estudo de toxicidade aguda, os grupos de camundongos *Swiss* fêmeas que foram tratados diariamente com as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg não demonstraram alterações indicativas de toxicidade quando analisados principalmente os parâmetros bioquímicos, hematológicos, peso corporal, consumo de alimento e água. A obtenção destes resultados é considerada importante pelo fato de que poderá ser desenvolvidos estudos em modelos animais para confirmar a atividade esquistosomicida do flavonoide 7-acetoxi-4-aril-3,4-di-hidroumarina sem que se provoque alterações de toxicidade.

**BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO  
PARA TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**

**PERSPECTIVAS**

## PERSPECTIVAS

1) Os resultados obtidos podem servir como base para o desenvolvimento de novos estudos com maior tempo de avaliação toxicológica em doses repetidas com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos de toxicidade desta substância, bem como utilizar outras espécies de animais.

3) Os resultados esquistossomicidas obtidos contra vermes adultos de *S. mansoni* inicialmente *in vitro*, destacam uma nova atividade farmacológica relacionado as Doenças Tropicais Negligenciadas. Sendo assim, esses resultados podem servir como base para o desenvolvimento de estudos em animais infectados por esquistossomas para confirmar a atividade esquistossomicida.

4) Determinar o possível mecanismo biológico de ação contra vermes adultos de *S. mansoni*.



**BIOPROSPECÇÃO DE UM NEOFLAVONOIDE SINTÉTICO  
PARA TRATAMENTO DE HELMINTÍASE - BATH**

**ANEXOS**

ANEXO A: Carta de aprovação do Comitê de ética em experimentação com animais.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS**  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 20 de setembro de 2011.

Ao (A)

**Prof (a): Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**  
**Departamento de Bioquímica e Farmacologia/ CCS / UFPI**

Sr. (a) Pesquisador (a)

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado: "**Estudos comportamentais e neuroquímicos de constituintes de óleos essenciais e derivados sintéticos**", foi avaliado pelo Comitê de ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO** sob o nº. 013/11. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,

  
Prof<sup>a</sup>. Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

ANEXO B:Capítulo publicado na *Current Bioactive Compounds* (B3)

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.ae](mailto:reprints@benthamscience.ae)

*Current Bioactive Compounds* 2017, 13, 000-000

1

## REVIEW ARTICLE

## Neoflavonoids as Prospective Compounds Against Parasitic Neglected Tropical Infections and Human Immunodeficiency Virus

Gláucio B. Saldanha<sup>a,\*</sup>, George L.S. Oliveira<sup>b</sup>, José C.C.L. da Silva<sup>b</sup>, Maria C. P. Oliveira<sup>c</sup>, Ana P.S.C.L. da Silva<sup>b</sup> and Juceni P. de Lima David<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Salvador 40170-280, BA, Brazil;* <sup>b</sup>*Department of Pharmacy, Post-Graduation Program in Biotechnology, Research Laboratory in Experimental Neurochemistry, Federal University of Piauí, Teresina 64049-550, Piauí, Brazil;* <sup>c</sup>*Department of Biology, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina 64049-550, Piauí, Brazil*

**Abstract: Background:** Neoflavonoids comprise a group of compounds that have a C6-C3-C6 carbon skeleton and that naturally occur in higher plants from families Clusiaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Passifloraceae, Asteraceae and Rutaceae.

**Objective:** Neoflavonoids have drawn great interest lately due to their pharmacological and biochemical

**ANEXO C:** Confirmação de submissão ao sistema editorial para a *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (B1)

Ms. No.: RTP-17-208

Title: Absence of toxicity in Swiss mice following treatment with 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin: acute and repeated-dose toxicity study

Corresponding Author: Dr. GEORGE LAYLSON DA SILVA OLIVEIRA

Authors: Gláucio Saldanha, Dr; Gláucia B Saldanha, Dr; Marina Sousa, Dr; Ana Paula Silva, Dr; Jorge David, Dr; Juceni David, Dr

Dear Dr. OLIVEIRA,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: RTP-17-208

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<https://ees.elsevier.com/rtp/>

Your username is: georgenota10@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/RTP/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/RTP/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Kind regards,

Nalini Kannan

Journal Manager

E-mail: [rtp@elsevier.com](mailto:rtp@elsevier.com)

**ANEXO D:** Confirmação de submissão ao sistema editorial para a *New Journal of Chemistry* (B1),

## Submission Confirmation

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**  
New Journal of Chemistry

**Manuscript ID**  
NJ-ART-06-2017-002332

**Title**  
Anthelmintic activity of 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin against adult worms of *Schistosoma mansoni*

**Authors**  
Saldanha, Gláucio  
OLIVEIRA, GEORGE  
David, Jorge  
David, Juceni

**Date Submitted**  
29-Jun-2017