

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Avaliação da ação anti-helmíntica *in vitro* de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiazolidin-4-onas contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes

Pelotas, 2016

Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes

Avaliação da ação anti-helmíntica *in vitro* de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiazolidin-4-onas contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Dr. Geonir Machado Siqueira

Co-orientadora: Dra. Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F363a Fernandes, Fabiane Knepper Zehetmeyr
Avaliação da ação anti-helmíntica *in vitro* de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiiazolidin-4-onas contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) / Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes. – 60f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2016. – Orientadora Geonir Machado Siqueira.; coorientadora Patrícia da Silva Nascente.

1.Tiazolidinonas. 2.*Fasciola hepatica* 3.Fasciolicidas.
4.Ensaio de eclosão de ovos. I Siqueira, Geonir Machado
II Nascente, Patrícia da Silva. III.Título.

CDD: 665.3

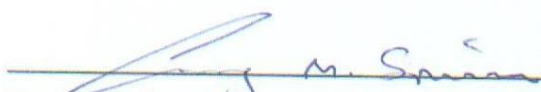
Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes

Avaliação da ação anti-helmíntica *in vitro* de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiazolidin-4-onas contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

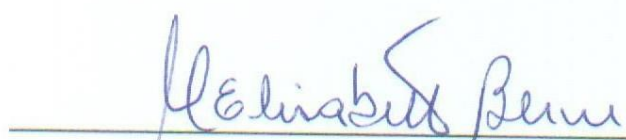
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 06 de setembro de 2016

Banca examinadora:


Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira (Orientador)

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria


Prof.ª Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas gerais


Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Dedico ao meu filho Guilherme, meu marido e companheiro Cristian, minha irmã Tatiane e a minha querida mãe Cecília (*in memoriam*).

Agradecimentos.

Agradeço a Deus e a todos os amigos espirituais por terem me abençoado e me dado forças para concluir mais essa etapa da minha jornada.

À minha família pelo apoio, compreensão e incentivo durante esta caminhada.

Ao Dr. Geonir Machado Siqueira pela confiança e oportunidade para a realização deste trabalho.

A banca examinadora: Prof^a Dra. Maria Elisabeth e Prof. Dr. Wilson por ter aceitado o convite para avaliar minha dissertação e, pelas suas valiosas contribuições.

A minha amiga, companheira de estudos e incentivadora Maria Antonieta Pereira Machado da Silva, seus ensinamentos foram fundamentais.

A amiga e colega de Mrs. Karine Massia Pereira pela força durante o mestrado e pelas valiosas ajudas e dicas na finalização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (Luiz, Karine, seu Enilton, Cláudio e dona Elsa) pela compreensão nos dias em que estive ausente devido às aulas e trabalhos de curso.

A colega Msc. Rosária Helena Machado Azambuja pelo incentivo e parceria nos trabalhos de laboratório.

Ao LaQuiABio pela síntese e caracterização das moléculas utilizadas neste trabalho, em especial ao colega Mrs. José Coan.

As biólogas Tatiana e Fabiane pela ajuda com seus conhecimentos.

À Prof. Dra. Silvia e a Laura do Departamento de Virologia da Universidade federal de Pelotas, pela gentileza de realizar os testes de citotoxicidade dos compostos estudados neste trabalho.

À Dra. Patrícia da Silva Nascente e todo pessoal de seu laboratório pelos ensinamentos e ajuda durante os primeiros passos desta minha jornada.

À Universidade Federal de Pelotas.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPel pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”
(Marthin Luther King)

Resumo

FERNANDES, Fabiane Knepper Zehetmeyr. **Avaliação da ação anti-helmíntica *in vitro* de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiazolidin-4-onas contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).** 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

As tiazolidin-4-onas são compostos heterocíclicos dos quais vêm apresentando diferentes atividades biológicas. Todavia, não há relatos de estudos com atividade anti-helmíntica, em específico contra o trematódeo *Fasciola hepatica*. Este helminto é o agente etiológico da fasciolose, doença que acomete humanos e animais, causando lesões no fígado e ductos biliares. O tratamento se dá através do uso de fármacos fasciolícticos como, por exemplo, triclabendazol e outros benzimidazóis, aos quais este parasito já apresenta resistência e estudos para o desenvolvimento de novos fármacos fasciolícticos são escassos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação ovicida *in vitro* por meio de ensaio de eclosão de ovos (EHA) de duas séries sistemáticas de tiazolidin-4-onas (2-aril-3-(2-morfolinopropil) tiazolidin-4-onas (**1a-h**) e 2-aril-3-(3-morfolinopropil) tiazolidin-4-onas (**2a-h**) sobre ovos de *F. hepatica*. Os EHA foram realizados em triplicata e acompanhados de controle negativo (água destilada e a suspensão de ovos), controle positivo (Tiabendazol 25 µg/mL e a suspensão de ovos) e controle do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,5% e a suspensão de ovos. Os compostos foram diluídos em DMSO de forma a se obter as concentrações finais de 0,002 µg/mL, 0,02 µg/mL, 0,2 µg/mL, 2 µg/mL e 20 µg/mL. O ensaio de citotoxicidade avaliou a função metabólica por atividade de desidrogenase mitocondrial de células de rim bovino (MDBK), utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para indicar a viabilidade celular. Foi observado que os compostos **1a-h** não apresentaram redução na relação de eclosão dos ovos em comparação ao grupo controle negativo. A série de compostos **2a-h** apresentaram efetiva redução ($p < 0,001$) na relação de eclosão dos ovos. O composto **2b** (aril = C₆H₄-2,4-F) apresentou uma eficácia de 96% na maior concentração (20 µg/mL) e uma viabilidade celular de 96%. O composto **2e** (aril = C₆H₄-4-Cl) apresentou eficácia contra os ovos de *F. hepatica* em todas as concentrações testadas, e a maior viabilidade celular (92%) ocorreu nas menores concentrações (0,02 µg/mL e 0,002 µg/mL). De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que, os compostos **1a-h** não apresentam ação ovicida contra ovos de *F. hepatica*, e os compostos **2a-h**, em especial os compostos **2b** e **2e** inibem a eclosão dos ovos de *F. hepatica*, podendo ser uma alternativa promissora para o controle da fasciolose.

Palavras-chave: Tiazolidinonas; *Fasciola hepatica*; Fasciolícticos; Ensaio de eclosão de ovos.

FERNANDES, Fabiane Knepper Zehetmeyr. **Anthelmintic action evaluation *in vitro* of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and of 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* eggs (Linnaeus, 1758).** 2016. 60 pg. Dissertation (Master of Science, knowledge area: Biochemistry and Bioprospecting) - Biochemical and Bioprospection Post Graduation Program, Chemical Sciences Center, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2016.

Abstract

Derivatives thiazolidin-4-ones are heterocyclic compounds which have shown different biological activities. However, there are no reports of studies with anthelmintic activity, in particular against the trematode *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*). This helminth is the etiologic agent of fascioliasis, a disease that affects humans and animals, causing damage to the liver and bile duct. The treatment takes place by using fasciolicidas drugs such as, for example, triclabendazole and other benzimidazoles, of which already shows this parasite resistance and studies for the development of new drugs are scarce fasciolicidas. Therefore the objective of this study was to evaluate the action ovicida through eggs hatch assay (EHA) of two systematic series of derivatives of thiazolidin-4-ones (2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones (**1a-h**) and 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones) (**2a-h**) on *F. hepatica* eggs. The EHA were performed in triplicate and accompanied by a negative control (distilled water and the suspension egg), positive control (Thiabendazole 25µg/mL and the suspension eggs) and control dimethylsulfoxide solvent (DMSO) in the concentration of 0.5 % and the suspension eggs. The Compounds were diluted in DMSO in order to obtain final concentrations of 0.002 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.2 µg/mL, 2 µg/mL e 20 µg/mL. The cytotoxicity assay evaluated the metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity bovine kidney cells (MDBK) using 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to indicate the viability cell. It was observed that the **1a-h** compounds presented no reduction in hatching ratio of eggs compared to the negative control group. The series of compounds **2a-h** show effective reduction ($p < 0.001$) in the ratio of hatching eggs. Compound 2b (aryl = C₆H₄-2,4-F) showed an efficacy of 96% at the highest concentration (20 µg/ml) and a cell viability of 96%. Compound 2e (aryl = C₆H₄-4-Cl) showed efficacy against *F. hepatica* eggs in all tested concentrations and the higher cell viability (92%) occurred at low concentrations (0.02 µg/ml to 0.002 µg/ml). According to the results, it can be stated that the compounds **1a-h** show no ovicidal activity against *F. hepatica* eggs, and compounds **2a-h**, in particular the compounds **2b** and **2e** inhibit hatching of eggs *F. hepatica* and could be a promising alternative for the control of fascioliasis.

Key words: Thiazolidinones; *Fasciola hepatica*; Fasciolicides; Eggs hatching assay

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química geral: (a) 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas; (b) 2-aril-3-(3-morfolinopropil)tiazolidin-4-onas.....	13
Figura 2	Estruturas químicas de alguns fármacos que possuem na sua estrutura ciclos heterocíclicos.....	14
Figura 3	Estrutura química do (a) anel tiazol, (b) anel tiazolidina e do (c) anel tiazolidin-4-ona.....	15
Figura 4	Representação da análise retrossintética de tiazolidin-4-onas (Adaptado de LIESEN et al., 2008).....	16
Figura 5	Imagem de um espécime de <i>Fasciola hepatica</i> logo após retirada do ducto biliar de fígado bovino contaminado com fasciolose (Fonte: Autor).....	19
Figura 6	Ciclo biológico da <i>Fasciola hepatica</i> . Fonte: http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html (Adaptado).....	20
Figura 7	Ovos de <i>Fasciola hepatica</i> : (a) recém eliminado, somente células germinativas; (b) após desenvolvimento do miracídio (Fonte: Autor). Ampliação da imagem x170.....	20
Figura 8	Ovos em fase de eclosão e miracídio: (a) Momento da eclosão do miracídio; (b) miracídio; (c) Ovo de <i>Fasciola hepatica</i> com opérculo aberto (Fonte: Autor). Ampliação da imagem x200.....	21
Figura 9	Estruturas químicas de fasciolicidas fenólicos halogenados: bitionol, hexaclorofeno e nitroxinil.....	25
Figura 10	Estruturas químicas de fasciolicidas salicilanilidas (a) closantel, (b) oxiclozanida e (c) rafoxanida.....	25
Figura 11	Estruturas químicas dos fasciolicidas benzimidazóis: albendazol, mebendazol, tiabendazol e triclabendazol.....	26
Figura 12	Estrutura química do fasciolicida clorsulon.....	27

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1	Compostos Heterocíclicos	15
3.2	Tiazolidin-4-onas.....	16
3.2.1	Estrutura e síntese.....	16
3.2.2	Estudos de atividade biológica de tiazolidinonas.....	18
3.3	Parasitismo	19
3.4	Biologia da F. hepatica: Habitat e Ciclo biológico	20
3.4.1	Fasciolose.....	23
3.4.2	Diagnóstico e Epidemiologia da Fasciolose	24
3.5	Fasciolicidas e seus mecanismos de ação	25
3.6	Resistência aos anti-helmínticos - fasciolicidas	28
4	ARTIGO	30
5	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

O estudo e síntese de novos fármacos vêm explorando os compostos heterocíclicos, uma vez que a maioria dos fármacos utilizados possui em sua estrutura química, pelo menos, um anel heterocíclico. Suas atividades biológicas são das mais variadas, tendo aplicações na área médica e veterinária (BARREIRO; FRAGA, 2008; KATZUNG et al., 2014; SPINOSA et al., 2014).

Dentre estes compostos têm-se os derivados de tiazolidin-4-onas, heterocíclico proveniente da tiazolidina, os quais vêm apresentando grande interesse científico (CUNICO et al., 2008; DEEP et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014). Há duas estratégias que podem ser empregadas para a síntese dessas moléculas, a saber: uma envolvendo reações entre compostos aceto-halogenados e tioaminas, e a outra através de reações de condensação com três componentes (aminas, aldeídos e ácido mercaptoacético) (LIESEN et al., 2008).

Os estudos avaliando atividades biológicas dos compostos derivados de tiazolidin-4-onas tem sido relatado em vários estudos (CUNICO et al., 2008; JAIN et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014). Todavia, até o presente momento não foram encontrados estudos sobre ação ovicida em *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

A fasciolose é uma doença parasitária causada pelos helmintos *F. hepatica* e *F. gigantia*. Trata-se de uma parasitose que acomete humanos e animais (por exemplo, bovinos e ovinos), causando lesões no fígado e ductos biliares do hospedeiro. Seu tratamento é realizado com fármacos anti-helmínticos conhecidos como fasciolicidas, como o triclabendazol, bitionol, closantel, niclosamida, clorsulon, entre outros (COUTURIER et al., 1999; MCCARTHY et al., 2012; RAMACHANDRAN et al., 2012; CHEN et al., 2013; ALMEIDA; AYRES, 2014a; KATZUNG et al., 2014).

Os fasciolicidas podem ser divididos em cinco grupos conforme suas estruturas químicas. O triclabendazol pertence à classe dos benzimidazóis e é o fármaco mais utilizado, possuindo ação sobre os estágios adultos e imaturos de *F. hepatica* (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a).

Todavia, casos de resistência de *F. hepatica* aos fasciolicidas já vêm sendo relatados desde a década de 1980 (BORAY; BONO, 1989). Estudos mais recentes relatam a resistência a este parasito em animais, tanto nas condições de

campo como de laboratório (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2006; ORTIZ et al., 2013; SANABRIA et al., 2013; HANNA et al., 2015), bem como em humanos (GIL et al., 2014).

Diante deste panorama onde há uma escassez de trabalhos sobre novos fasciolícidias e a eminente resistência aos fármacos existentes no mercado, se faz necessário estudos que busquem novas moléculas para o tratamento da fasciolose. Devido ao fato de que as moléculas de tiazolidin-4-onas vem apresentando diferentes atividades biológicas é possível que esses compostos também apresentem ação fasciolicida.

Desta forma, a investigação da ação ovicida de novas moléculas derivadas de tiazolidin-4-onas sobre o trematódeo *F. hepatica*, é inovadora e tem muito a contribuir com a descoberta de novos fármacos ativos na terapêutica da fasciolose.

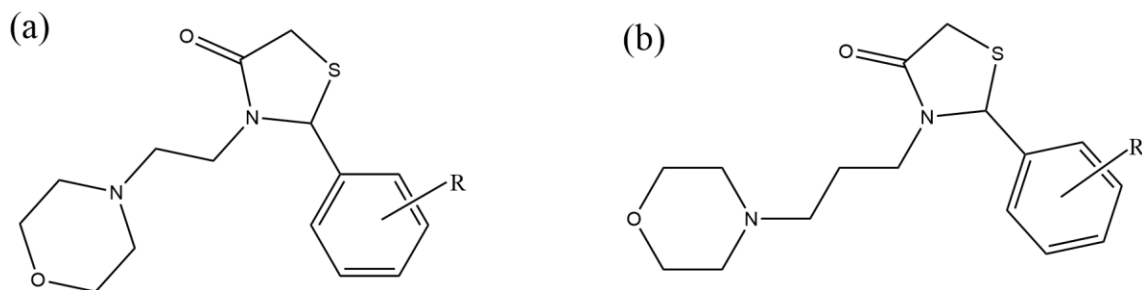
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ação anti-helmíntica ovicida *in vitro* de duas séries sistemáticas de de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas (aril = C₆H₄-4-OMe; C₆H₄-4-NO₂; C₆H₄-4-Cl; C₆H₄-2-F; C₆H₄-2,4-F; C₆H₄-2,4-Cl; C₆H₄-2,6-Cl; C₆H₄-2-F,6-Cl) e de 2-aril-3-(3-mofolinopropil)tiazolidin-4-onas (aril = C₆H₄-2-OMe; C₆H₄-4-OMe; C₆H₄-4-NO₂; C₆H₄-4-Cl; C₆H₄-4-F; C₆H₄-2,4-F; C₆H₄-2,4-Cl; C₆H₄-2,6-Cl) sobre ovos de *F. hepatica*.

2.2 Objetivos Específicos

- (a) Avaliar o potencial ovicida *in vitro* dos compostos derivados de 2-aril-3-(2-mofolinoetil)tiazolidin-4-onas (Figura 1a) e derivados de 2-aril-3-(3-mofolinopropil)tiazolidin-4-onas (Figura 1b).



R = 2-OMe; 4-OMe; 4-NO₂; 4-Cl; 4-F; 2,4-F; 2,4-Cl; 2,6-Cl; 2-F,6-Cl

Figura 1. Estrutura química geral: (a) 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas; (b) 2-aril-3-(3-mofolinopropil)tiazolidin-4-onas.

- (b) Inferir a melhor concentração ovicida de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-mofolinopropil)tiazolidin-4-onas, para classificá-los segundo o índice de eficácia proposto pelo *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP).
- (c) Determinar a citotoxicidade *in vitro* de derivados de 2-aril-3-(2-morfolinoetil)tiazolidin-4-onas e de 2-aril-3-(3-mofolinopropil)tiazolidin-4-onas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Compostos Heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos possuem um papel importante quando o assunto trata-se de síntese de novos fármacos. Isso é confirmado pelo fato de que a maioria dos fármacos possui em sua estrutura química, pelo menos, um anel heterocíclico. Estes apresentam atividades farmacológicas diversificadas e são consumidos mundialmente, tanto na área humana como também na área veterinária (BARREIRO; FRAGA, 2008; KATZUNG et al., 2014; SPINOSA et al., 2014)

Alguns exemplos de fármacos que possuem em sua estrutura anéis heterocíclicos podem ser citados, tais como: furosemida (diurético); captopril (anti-hipertensivo); diazepam (sedativo-hipnótico); imipramina (antidepressivo); piroxicam (antiinflamatório); fluconazol (antifúngico); penicilina (antibiótico); aciclovir (antiviral); albendazol (antiparasitário); amorolfina (antifúngico) e rosiglitazona (reduz a resistência da insulina) (Figura 2) (BARREIRO; FRAGA, 2008; KATZUNG et al., 2014).

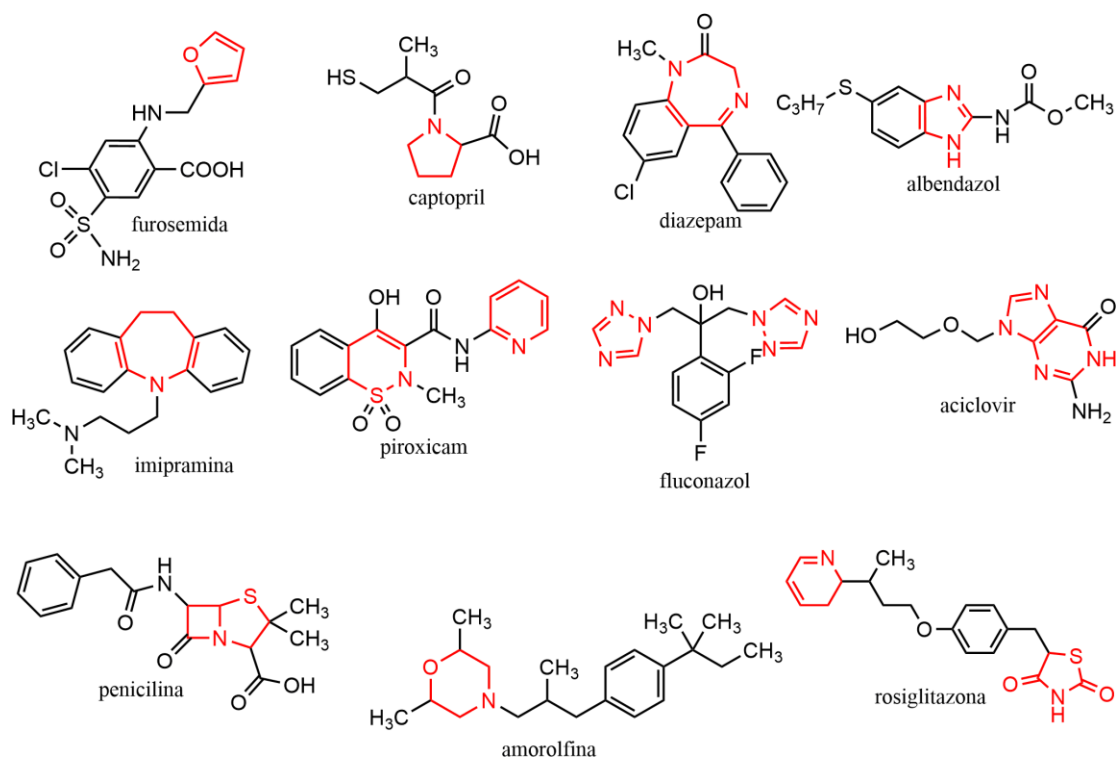


Figura 2. Estruturas químicas de alguns fármacos que possuem na sua estrutura ciclos heterocíclicos.

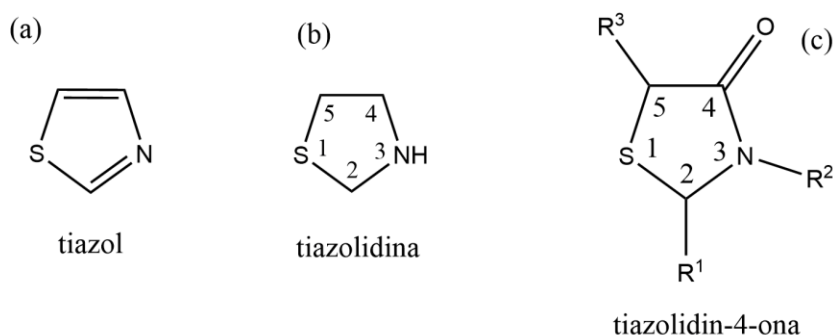
Os compostos heterocíclicos a serem estudados neste trabalho referem-se a duas séries sistemáticas denominados genericamente de tiazolidin-4-onas (heterocíclico de cinco membros com um átomo de enxofre na posição-1, um átomo de nitrogênio na posição-3 e uma carbonila na posição-4) (CUNICO et al., 2008; TRIPATHI et al., 2014).

3.2 Tiazolidin-4-onas

3.2.1 Estrutura e síntese

Compostos contendo o anel tiazol (Figura 3a) ou o anel tiazolidina (Figura 3b) são de considerável interesse em diferentes áreas da química medicinal. No entanto, as classes derivadas da tiazolidina, como as tiazolidinonas são as mais estudadas. As tiazolidinonas são derivadas da tiazolidina, ciclo de cinco membros com um átomo de enxofre na posição-1 e um nitrogênio na posição-3 (Figura 3). O primeiro reconhecimento da aparição do ciclo tiazolidina, em fármacos naturais, foi na estrutura da penicilina (Figura 2) (JAIN et al., 2012, 2013; TRIPATHI et al., 2014).

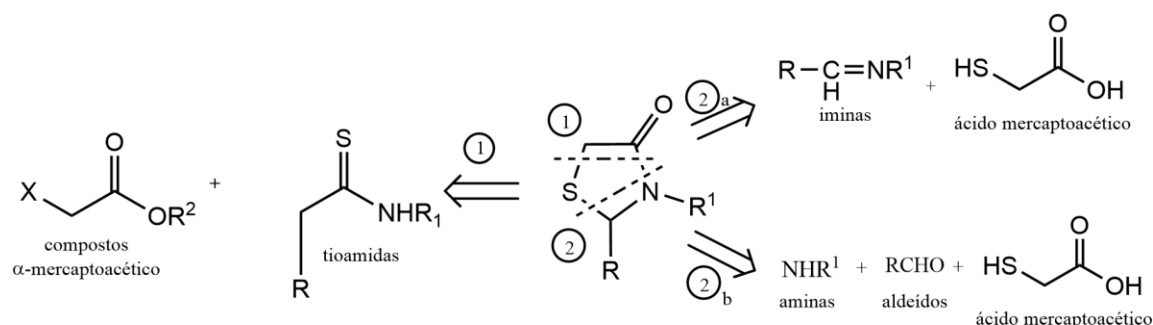
A classe de moléculas compostas por derivados de tiazolidin-4-onas representa grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e biológicas (CUNICO et al., 2008; JAIN et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014). A estrutura base da tiazolidin-4-onas pode apresentar diversos grupos químicos como substituintes nas posições 2, 3 e 5 (Figura 3c).



$R^1, R^2, R^3 =$ alquil, aril, hetroalquil, heteroaril

Figura 3. Estrutura química do (a) anel tiazol, (b) anel tiazolidina e do (c) anel tiazolidin-4-ona.

Com base na análise retróssintética (Figura 4) as estratégias que podem ser empregadas na síntese de tiazolidin-4-onas são duas, a saber: (i) formação das ligações C₅-S e C₄-N, a partir de reações envolvendo compostos α-aceto-halogenados e tioamidas (Figura 4, 1) e (ii) formação das ligações C₂-S e C₄-N envolvendo reações entre iminas substituídas e ácido mercaptoacético (Figura 4, 2a) ou através de reações de condensação entre aminas, aldeídos e ácido mercaptoacético (Figura 4, 2b) (CUNICO et al., 2008; LIESEN et al., 2008).



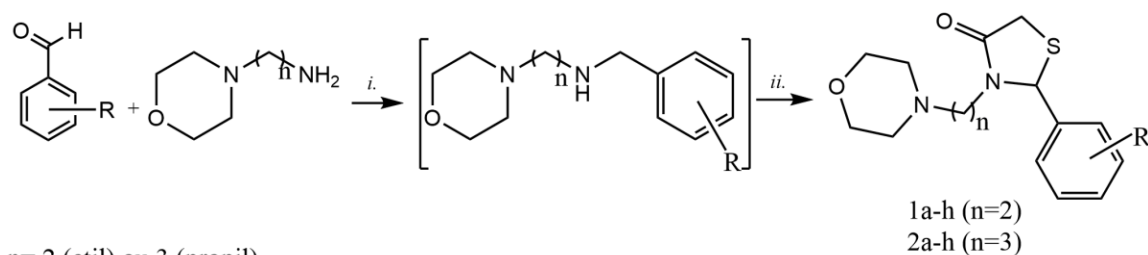
R¹, R² = alquil, aril; X = SH

Figura 4. Representação da análise retróssintética de tiazolidin-4-onas (Adaptado de LIESEN et al., 2008).

De acordo com as revisões de Jain e colaboradores (2012) e Tripathi e colaboradores (2014) existem várias metodologias de síntese de tiazolidin-4-ona relatadas na literatura. Todavia, as principais vias de síntese são as que envolvem os três componentes (um aldeído ou cetona, uma amina primária e o ácido mercaptoacético).

O presente estudo trabalhou com duas séries de tiazolidin-4-onas sobre ovos de *F. hepatica*, a saber: 2-aril-3-(2-morfolinoetil) tiazolidin-4-onas (aril = C₆H₄-4-OMe; C₆H₄-4-NO₂; C₆H₄-4-Cl; C₆H₄-2-F; C₆H₄-2,4-F; C₆H₄-2,4-Cl; C₆H₄-2,6-Cl; C₆H₄-2-F,6-Cl) e de 2-aril-3-(3-mofolinopropil) tiazolidin-4-onas (aril = C₆H₄-2-OMe; C₆H₄-4-OMe; C₆H₄-4-NO₂; C₆H₄-4-Cl; C₆H₄-4-F; C₆H₄-2,4-F; C₆H₄-2,4-Cl; C₆H₄-2,6-Cl). Os compostos foram sintetizados (Esquema 1) e caracterizados conforme metodologia adotada por Gouvea e colaboradores (2016).

Esquema 1.



n= 2 (etil) ou 3 (propil)

R= 2-F; 4-F; 2,4-F; 2,4-Cl; 4-Cl; 4-NO₂; 4-OCH₃; 2-F,6-Cl; 2-OCH₃

Reagentes e condições: (i) tolueno, 110°C, 3h; (ii) HSCH₂COOH, 110°C, 16h.

3.2.2 Estudos de atividade biológica de tiazolidinonas

A fim de contribuir com a ampliação e disponibilidade de moléculas com potencial biológico, vários estudos estão sendo realizados avaliando a atividade biológica de diferentes moléculas derivadas de tiazolidin-4-onas (CUNICO et al., 2008; JAIN et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014). Buscas realizadas, em diferentes bases de pesquisa, por trabalhos que envolvem tiazolidin-4-onas e atividade biológica revelam que essa classe de moléculas vem mostrando diferentes potenciais biológicos.

Algumas atividades biológicas destas moléculas podem ser citadas, a saber: **anti-HIV** (RAVICHANDRAN et al., 2009; CHEN et al., 2011); **anti vírus hepatite C** (RAWAL et al., 2008); **antibacteriana** (RANE et al., 2012); **anti-diabetes** (OTTANÀ et al., 2011); **antifibrótica** (KAMINSKYY et al., 2016); **anti-inflamatório** (DEEP et al., 2012); **antimicobacteriano e antitumoral** (GÜZEL; SALMAN, 2006); **anti-oxidante** (OTTANÀ et al., 2011; JÚNIOR et al., 2013); **antiprotzoários** (HAVRYLYUK et al., 2013; OLIVEIRA FILHO, DE et al., 2015), **antifúngica** (KUNZLER et al., 2013; MARQUES et al., 2014; MONTE, DE et al., 2016; SECCI et al., 2016), **anti-tumoral** (GÜZEL; SALMAN, 2006); **antiviral** (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013; MANVAR et al., 2016), **anti-tuberculose** (VINTONYAK et al., 2011).

Embora haja uma grande variedade de relatos de atividades biológicas das moléculas derivadas de tiazolidin-4-onas, não foi encontrado nenhum trabalho relatando atividade ovicida contra trematódeos, em específico para ovos de *F. hepatica*.

3.3 Parasitismo

Parasitismo é uma relação desarmônica onde existe unilateralidade de benefícios entre dois organismos: o hospedeiro e o parasito, vivendo o segundo à custa do primeiro, pois dele obtêm nutrientes e abrigo (VILLELA; FERRAZ, 2007; MORAES et al., 2008). Os parasitos podem ser classificados como fitoparasitos e zooparasitos. Sendo que, bactérias e fungos compõem os fitoparasitos e os protozoários, helmintos e artrópodes compõem os zooparasitos (VILLELA; FERRAZ, 2007).

Os parasitos que podem acometer os animais e o homem estão incluídos em cinco grandes filos, a saber: (a) Platyhelminthes: formado por parasitos achatados; (b) Nematoda: parasitos que apresentam a forma de filo ou filamento; (c) Acantocephala: constituído por parasitos arredondados; (d) Protozoa: seres unicelulares; e (e) Arthropoda: insetos e ácaros em geral (VILLELA; FERRAZ, 2007).

Eles podem ser divididos em dois grupos: os endoparasitos que vivem dentro do corpo do hospedeiro, representados pelos filos Platyhelminthes, Nematoda, Acantocephala e Protozoa, e os ectoparasitos que vivem sobre o corpo do hospedeiro, sendo representados pelo filo Arthropoda. Há também os hiperparasitos que se refere aos parasitos que parasitam outro parasito. Um exemplo de hiperparasito são os cocobacilos que parasitam o protozoário *Entamoeba histolytica* (VILLELA; FERRAZ, 2007; GUIMARÃES, 2012).

Os filos ainda podem ser subdivididos em classes como ocorre com o filo Platyhelminthes, no qual seus representantes estão distribuídos pelas classes: (i) Tubbelaria, (ii) Trematoda e (iii) Cestoda. Sendo que, as classes de interesse para parasitologia humana são somente as classes Cestoda e Trematoda. A classe cestoda é constituída por parasitos endoparasitas de corpo, em geral, alongado e constituído por segmentos; e a classe trematoda é constituída por ecto e endoparasitos habitualmente achatados dorsoventralmente e forma típica de folha (URQUHART et al., 1998; GUIMARÃES, 2012).

O parasito deste estudo pertence ao Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Família *Fasciolidae*, gênero *Fasciola* e espécie *F. hepatica* (URQUHART et al., 1998; FORTES, 2004).

3.4 Biologia da *F. hepatica*: Habitat e Ciclo biológico

As espécies de *Fasciola*, comumente conhecidas como trematódeos hepáticos, pertencentes à Classe Trematoda da Família Fasciolidae, sendo *F. hepatica* e *Fasciola gigantica* as espécies mais importantes. A distribuição geográfica é cosmopolita, todavia *F. hepatica* é mais encontrada em áreas temperadas e em áreas mais frias de grande altitude nos trópicos e subtrópicos, e a ocorrência de *F. gigantica* predomina nas áreas tropicais (SILVA et al., 1980; URQUHART et al., 1998).

Fasciola hepatica tem como hospedeiros a maioria dos mamíferos, sendo os ovinos e bovinos os mais importantes. Nos hospedeiros habituais as espécies adultas são encontradas nos ductos biliares mais calibrosos e, os trematódeos imaturos no parênquima hepático. O homem não é um hospedeiro habitual da *F. hepatica*, todavia quando infectado por este parasito o mesmo pode ser encontrado nas vias biliares, nos alvéolos pulmonares e, esporadicamente em outros locais (URQUHART et al., 1998; MÜLLER, 2007).

Os espécimes adultos possuem formato de folha, coloração castanho-acinzentada e medem cerca de 3,5 cm de comprimento e 1 cm de largura (Figura 5). Seu ciclo biológico necessita de hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Lymnaea*, e um hospedeiro definitivo (mamífero) (URQUHART et al., 1998; FAIRWEATHER; BORAY, 1999; MÜLLER, 2007).



Figura 5. Imagem de um espécime de *Fasciola hepatica* logo após retirada do ducto biliar de fígado bovino contaminado com fasciolose (Fonte: Autor).

O ciclo biológico de *F. hepatica* compreende desde a eliminação dos ovos nas fezes do hospedeiro mamífero, penetração do miracídio no hospedeiro

Sob o estímulo da luz, o miracídio libera uma enzima que digere o cemento protéico que mantém o opérculo no lugar, liberando o miracídio (Figura 8) (URQUHART et al., 1998).



Figura 8. Ovos em fase de eclosão e miracídio: (a) Momento da eclosão do miracídio; (b) miracídio; (c) Ovo de *Fasciola hepatica* com opérculo aberto (Fonte: Autor). Ampliação da imagem x 200.

Para dar continuidade no seu desenvolvimento, o miracídio deve encontrar um molusco do gênero *Lymnaea* em poucas horas. A literatura relata que supostas respostas quimiotásticas direcionem o miracídio para encontrar o molusco e, ao contato, adere por sucção ao molusco e penetra em seus tecidos moles com o auxílio de uma enzima citolítica (URQUHART et al., 1998).

Após o miracídio penetrar no molusco perde seus cílios, e desenvolve em um saco alongado, o esporocisto. Este contém uma série de células que se desenvolvem em rédias, que também são formas larvais. Das células germinativas das rédias, em condições ambientais favoráveis para os caramujos, surgem aos estágios finais no hospedeiro intermediário, as cercárias. Estas são trematódeos jovens com caudas longas que emergem ativamente do caramujo, em quantidades consideráveis, sob estímulo de alteração na temperatura ou na intensidade da luz (BORAY, 1969; SILVA et al., 1980; URQUHART et al., 1998).

As cercarias nadam por algum tempo, aproximadamente uma hora, fixam-se à vegetação, como as folhas de capim, perdem a cauda e se encistam. Assim, tem-se o estágio denominado metacercária infectantes. Neste estágio há um grande potencial de sobrevivência que se estende por meses. O processo de desenvolvimento do miracídio à metacercária compreende um mínimo de seis a sete semanas e, a infecção de um caramujo por um miracídio pode produzir cerca

de 225 metacercárias, as quais possuem a maior longevidade infectiva na faixa de 10 a 15°C (URQUHART et al., 1998; MÜLLER et al., 1999).

Após ser ingerida pelo hospedeiro definitivo a parede externa da metacercária é removida no tubo digestivo pela ação de enzimas digestivas, pH, CO₂ e sais biliares. A liberação da larva ocorre no intestino delgado por ação de origem enzimática, atravessam a parede intestinal e migram para o parênquima hepático (formas imaturas) e os ductos biliares (formas adultas) e ocasionalmente para a vesícula biliar (URQUHART et al., 1998).

3.4.1 Fasciolose

A fasciolose é uma doença parasitária causada pelo trematódeo *F. hepatica* ou *F. gigantia*. Trata-se de um processo inflamatório crônico do fígado e ductos biliares. Sua ocorrência é mais acentuada em ovinos, bovinos, podendo atingir vários mamíferos domésticos e silvestres e, inclusive o homem (ADRIEN et al., 2013; TESSELE et al., 2013).

Esta parasitose pode ser aguda, subaguda ou crônica. Na doença aguda há uma ingestão de grandes quantidades de metacercárias (acima de 2000) e o fígado encontra-se dilatado e hemorrágico, resultado da ruptura de vasos sanguíneos pelos jovens trematódeo migrando no parênquima hepático. Quando são ingeridas metacercárias por um tempo mais longo, ocorre a chamada doença subaguda. Nesta, o fígado também se encontra dilatado com numerosos trajetos necróticos ou hemorrágicos visíveis na superfície e no parênquima. A fasciolose crônica corresponde à forma mais comum da doença e, é causada após ingestão de quantidades moderadas de metacercárias (200 a 500) (URQUHART et al., 1998; ADRIEN et al., 2013; TESSELE et al., 2013).

Dentre os efeitos patogênicos da fasciolose nos bovinos e ovinos encontram-se a anemia, a hipoalbuminemia, a perda progressiva de condições físicas e de desenvolvimento, com prejuízo de produtividade de leite e de carne, além da mortalidade dos animais (OAKLEY et al., 1979; URQUHART et al., 1998). Um trabalho de revisão sobre *F. hepatica* estima que mundialmente mais de 330 milhões de bovinos e 250 milhões de ovinos pastam em áreas onde há formas infectantes de *F. hepatica*, representando perdas anuais de três bilhões de dólares (ALEIXO et al., 2015).

No homem o número de formas presentes no organismo não costuma ser elevado. Quando presentes as formas imaturas do parasito, devido a sua migração, provocam lesões no parênquima hepático. Na forma adulta este parasito provoca ulcerações e irritações do endotélio dos ductos biliares, levando a uma hiperplasia epitelial. As alterações decorrentes levam a uma diminuição do fluxo biliar, provocando cirrose e insuficiência hepática (GUIMARÃES, 2012).

3.4.2 Diagnóstico e Epidemiologia da Fasciolose.

O diagnóstico clínico da fasciolose é difícil de ser feito, por isso o diagnóstico laboratorial é o mais recomendado. Este pode ser feito pela pesquisa de ovos nas fezes ou na bile. No homem a produção de ovos é pequena, logo, o diagnóstico sorológico é o mais recomendado por oferecer uma maior confiabilidade no resultado (ROJO-VÁZQUEZ et al., 2012; ADRIEN et al., 2013).

Há alguns fatores principais que influenciam a produção de quantidades elevadas de metacercárias e conseqüente episódios de surtos de fasciolose, a saber: disponibilidade de *habitats* adequados para os caramujos (locais úmidos, lodosos e temperatura entre 14,4-22,8°C); temperatura (o desenvolvimento e eclosão dos ovos de *F. hepatica*, bem como a reprodução do hospedeiro intermediário, cessam a 5°C); umidade, a qual é estabelecida quando as chuvas excedem a transpiração e se atinge a saturação do meio ambiente. (MULLER et al., 1998; URQUHART et al., 1998).

No homem a forma de infecção se dá através da ingestão de água ou verduras contaminadas com metacercárias (GUIMARÃES, 2012). A fasciolose é uma zoonose que já vem sendo relatada em diversos trabalhos. Dentre estes estudos podem ser citados os casos relatados na França (COUTURIER et al., 1999), em diferentes estados da Índia (RAMACHANDRAN et al., 2012), na China (CHEN et al., 2013), no Reino Unido (DRONAMRAJU et al., 2014), no Paquistão (QURESHI et al., 2016), em Cuba (ESCALONA et al., 2012), no Chile (GIL et al., 2014), na Venezuela (NOYA et al., 2006), e no estado do Rio Grande do Sul – Brasil (CORAL et al., 2007).

No que tange aos ruminantes vários trabalhos relatam a incidência desta parasitose em diferentes países (DIJK, VAN et al., 2010; BENNEMA et al., 2014; ANDREANI et al., 2015). No Brasil a prevalência de *F. hepatica* no período de 2002 a 2011 foi em média de 6,32%, sendo que no estado do Rio Grande do Sul

a prevalência foi maior (14,39%), seguido pelo estado de Santa Catarina (4,5%), enquanto que nos demais estados a prevalência variou entre 0 e 3% (BENNEMA et al., 2014).

3.5 Fasciolícidias e seus mecanismos de ação

O controle de helmintos baseia-se, quase que totalmente, na utilização de anti-helmínticos, os quais reduzem a eliminação de ovos nas fezes e assim interrompem o ciclo biológico do parasito. Estes fármacos, antes da década de 1960, possuíam reduzido espectro de ação e estreita margem de segurança (ALMEIDA; AYRES, 2014b).

O índice de eficácia destes fármacos, segundo a *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), deve ser expresso contra cada gênero/espécie (larvas/adultos). Estes recebem uma classificação de acordo com o percentual de redução das formas larvais e/ou adultas do parasito, a saber: altamente eficaz (mais de 98%), eficazes (90-98%), moderadamente eficazes (80-89%) ou insuficientemente ativo (menos de 80%) (WOOD et al., 1995).

Em 1926 o tetracloreto de carbono (CCl_4) começa a ser utilizado como anti-helmíntico para o tratamento da fasciolose. Na década de 1961, começam a serem descobertos anti-helmínticos com amplo espectro de atividade, maior eficácia e menor toxicidade (ALMEIDA; AYRES, 2014b).

O modo de ação dos anti-helmínticos, em geral, está relacionado com a interferência na produção de energia, na coordenação neuromuscular e da dinâmica microtubular. Estas interferências acabam causando a destruição dos parasitos por inanição, quando esgotam suas reservas energéticas, ou a sua expulsão decorrente de paralisia (ALMEIDA; AYRES, 2014b).

Os anti-helmínticos utilizados para o controle e tratamento de infecções causadas por *F. hepatica* são denominados fasciolícidias, os quais agem em um ou mais estágios de desenvolvimento do trematódeo, bem como possuem seus mecanismos de ação diferenciados (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a). Os fasciolícidias podem ser agrupados em cinco grupos de acordo com suas características químicas, a saber: fenóis halogenados, salicilanilidas, benzimidazóis, sulfonamidinas (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a) e fenoxialcanos (FAIRWEATHER; BORAY, 1999).

Como exemplos de fenóis halogenados têm-se o bitionol, hexaclorofeno, niclofolan e nitroxinil (Figura 9). Os fármacos deste grupo são eficazes contra parasitos adultos, porém não são eficazes nos estágios imaturos (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a).

O mecanismo de ação dos fenóis halogenados está relacionado ao bloqueio da produção de energia por inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial (ALMEIDA; AYRES, 2014a). Estes fasciolicidas também podem agir como inibidores das enzimas chaves deste processo, a desidrogenase de malato e a desidrogenase succínico (PANITZ; KNAPP, 1970; LWIN; PROBERT, 1975). A ruptura do sistema reprodutor com a conseqüente diminuição de ovos, também é relatada como possível mecanismo de ação dos fasciolicidas fenólicos halogenados (DAWES, 1966; STAMMERS, 1976).

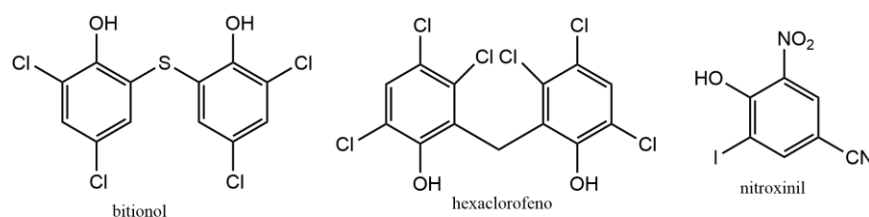


Figura 9. Estruturas químicas de fasciolicidas fenólicos halogenados: bitionol, hexaclorofeno e nitroxinil.

No segundo grupo de fasciolicidas, as salicilanilidas, as quais foram empregadas como anti-helmíntico a partir da década de 1960, podem-se citar como exemplo o closantel, a oxiclozanida e a rafoxanida (Figura 10). Estes fármacos são altamente ativos contra formas adultas e mostra boa atividade contra formas imaturas com mais de 6-8 semanas

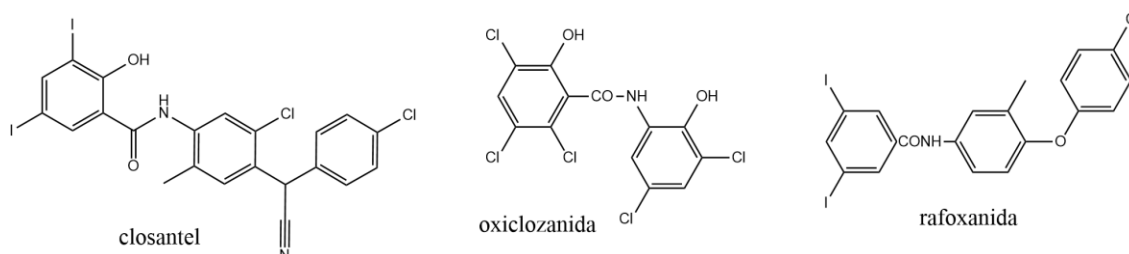


Figura 10. Estruturas químicas de fasciolicidas salicilanilidas: closantel, oxiclozanida e rafoxanida

As salicilanilidas são desacopladores da fosforilação oxidativa mitocondrial, interferindo na biotransformação energética do parasito (FAIRWEATHER;

BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a). Há também estudos que demonstram a ação anti-helmíntica de salicilanilidas, neste caso a rafoxanida, através da interrupção da espermatogênese (STAMMERS, 1975).

No grupo dos benzimidazóis encontram-se, por exemplo, o albendazol, o mebendazol, o triclabendazol e tiabendazol (Figura 11) (FAIRWEATHER; BORAY, 1999). A maioria dos fármacos deste grupo é utilizada principalmente para infecções causadas por nematódeos, possuindo pouca ou nenhuma ação sobre *F. hepatica*. Entretanto, o triclabendazol apresenta alta eficácia sobre os estágios adultos e imaturos de *Fasciola*. Outros benzimidazóis apresentam ação contra trematódeos, porém requerem doses mais elevadas (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a).

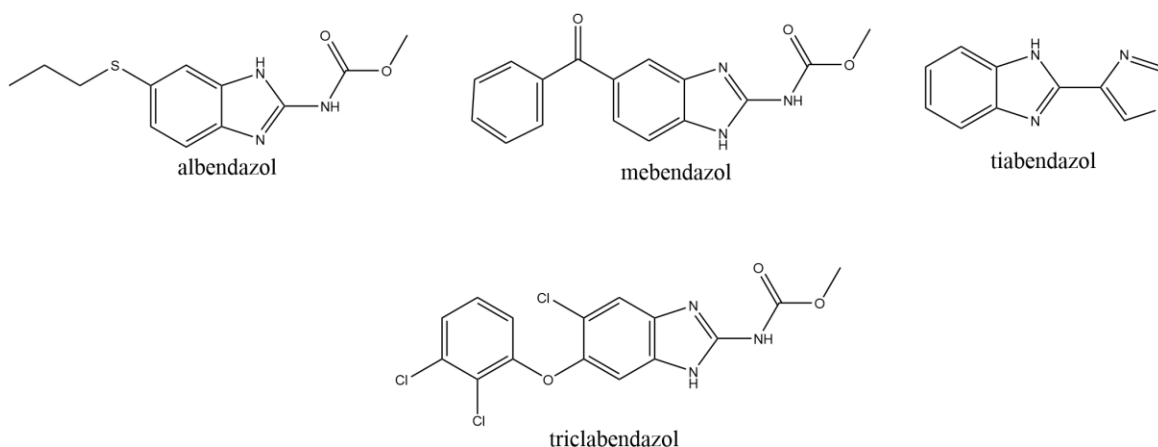


Figura 11. Estruturas químicas dos fasciolicidas benzimidazóis: albendazol, mebendazol, tiabendazol e triclabendazol.

O mecanismo de ação dos benzimidazóis está relacionado com a despolimerização de microtúbulos citoplasmáticos. Estes fasciolicidas se ligam a tubulina interrompendo assim os processos baseados em microtúbulos nos helmintos (LACEY, 1988; LUBEGA; PRICHARD, 1990, 1991).

Outro exemplo de fasciolicidas é o clorsulon (Figura 12), o qual é classificado como sulfonamidina. Este anti-helmíntico é eficaz no controle de estágios adultos e imaturos de *F. hepatica*. Sua ação está relacionada com o bloqueio da glicólise através da inibição das enzimas glicolíticas (fosfogliceroquinase e fosfogliceromutase), resultando no bloqueio da produção de energia do parasito (FAIRWEATHER; BORAY, 1999; ALMEIDA; AYRES, 2014a).

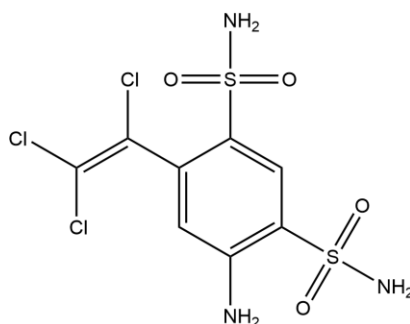


Figura 12. Estrutura química do fasciolicida clorsulon.

No último grupo de fasciolicidas, os fenoxialcanos, encontra-se a diamfenetida. Embora Fairweather & Boray (1999) fazerem referência a este grupo, uma pesquisa realizada no site Periódicos Capes com a palavra-chave “*diamphenethide*” mostrou que atualmente não estão sendo publicados trabalhos com este fasciolicida. A pesquisa gerou um relatório de 28 trabalhos publicados entre 1981 e 1999, sendo que a maioria encontra-se na década de 1980. Tais dados podem inferir que a diamfenetida não está sendo utilizada no combate da fasciolose na atualidade.

3.6 Resistência aos anti-helmínticos - fasciolicidas

A resistência de *F. hepatica* aos fasciolicidas já vem sendo relatada desde o final da década de 1980, quando Boray e De Bono (1989) relataram aos primeiros casos de resistência em condições de campo e de laboratório. Desde então, vários casos vem sendo relatados em diversos países: Espanha (ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2006), Argentina (OLAECHEA et al., 2011; SANABRIA et al., 2013), Reino Unido (CANEVARI et al., 2013), Peru (ORTIZ et al., 2013) e Irlanda do Norte (HANNA et al., 2015).

Alvarez-Sánchez e colaboradores (2006) relatam a primeira descrição, na Espanha, de resistência de *F. hepatica* frente aos fasciolicidas albendazol e ticlabendazol. O estudo consistiu em selecionar animais de um rebanho de ovelhas com suspeita de resistência aos anti-helmínticos e, de outro rebanho (grupo controle) sem aparente problema com tal resistência. Os animais foram divididos em três grupos, cada um recebeu um tratamento diferente, a saber: um com triclabendazol, outro com albendazol e o terceiro com a combinação de ivermectina e clorsulon. Após contagem dos ovos fecais e comparação com o

grupo controle foi observada uma reduzida eficácia de ambos fasciolicidas (albendazol de 93,6% para 46,4%; triclabendazol de 100% para 75,7%; e ivermectina/clorsulon de 100% para 73,4%).

Na Argentina, devido à morte de bovinos por fasciolose crônica, mesmo com quatro tratamentos com triclabendazol, foi realizado um estudo para determinar a resistência da *F. hepatica* a este fasciolicida (OLAECHEA et al., 2011). Os animais deste rebanho foram divididos em três grupos, um foi tratado com a dose recomendada de triclabendazol, outro com o dobro da dose recomendada e o terceiro foi tratado com closantel. Os resultados mostraram uma redução de 100% na produção de ovos de *F. hepatica* nos dias 14 e 21 após tratamento com closantel, porém o triclabendazol não mostrou nenhum efeito, mesmo com o uso do dobro da dosagem recomendada. Tal fato demonstrou que, para este rebanho estudado, já havia forte indicativo de resistência de *F. hepatica* frente ao triclabendazol.

Estes trabalhos são exemplos de casos, em animais, da resistência de *F. hepatica* frente à fasciolicidas mais utilizados. Há também relatos de casos de resistência em tratamentos em fasciolose humana como, por exemplo, no Chile (GIL et al., 2014).

Estes autores relataram quatro casos de pacientes com infecção parasitária persistente, mesmo após vários ciclos de tratamento com triclabendazol. Em três casos a infecção se originou pela ingestão de agrião, e o quarto caso devido à ingestão de água não tratada de poços e córregos os quais os animais tinham acesso.

4 ARTIGO

Atividade ovicida *in vitro* de 2-aryl-3-(2-morpholinoetil)thiazolidin-4-ones de e de 2-aryl-3-(3-morpholinopropil)thiazolidin-4-ones contra ovos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes, Maria Antonieta Machado Pereira da Silva, Karine Massia Pereira, Maria Elisabeth Aires Berne, Wilson Cunico, José Coan Campos Júnior, Daniela Pires Gouvea, Patrícia da Silva Nascente, Silvia de Oliveira Hübner e Geonir Machado Siqueira

O manuscrito foi digitado segundo normas gerais da revista ***Veterinary Parasitology*** (Ciências Biológicas II – B1 e fator de impacto 2,242), porém as figuras e tabelas foram incluídas no texto para facilitar a leitura, não seguindo as normas do referido periódico.

Ovicidal activity *in vitro* of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and 2-aryl-3-(3-morpholino-propyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).

Fabiane Knepper Zehetmeyr Fernandes^{1,2}, Maria Antonieta Machado Pereira da Silva¹, Karine Massia Pereira¹, Maria Elisabeth Aires Berne³, Wilson Cunico², José Coan Campos Júnior², Daniela Pires Gouvea², Patrícia da Silva Nascente⁴, Silvia de Oliveira Hübner⁵ and Geonir Machado Siqueira^{2*}

¹*Departamento of Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.*

²*Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Universidade Federal de Pelotas, Brasil*

³*Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.*

⁴*Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.*

⁵*Laboratório de Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.*

Corresponding author at:

Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, CP 354, 96010-900 Pelotas-RS, Brazil

E-mail: siqueiragm@gmail.com

E-mail: fkzfernandes@gmail.com

25 Abstract

26 Although there are variety biological activity reports of compounds derived from
27 thiazolidin-4-ones, it was not found any work related to the ovicidal activity against
28 trematodes, in specific for *Fasciola hepatica*(*F. hepatica*) eggs, etiological agent of
29 fascioliasis. Also in the literature, it is possible to find drug resistance reports used
30 for the treatment of this disease. Thus, this study evaluated the anthelmintic action
31 (ovicidal) in vitro in two systematic series of thiazolidine-4-ones against *F. hepatica*
32 eggs: 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones derivatives (**1a-h**) and 2-aryl-3-
33 (2-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones derivatives (**2a-h**). Egg hatch assay (EHA)
34 was used to confirm the efficiency of the compounds tested at different
35 concentrations as an anthelmintic, and also to evaluate cellular metabolic function
36 by mitochondrial dehydrogenase activity to verify cell viability in bovine kidney
37 cells (MDBK). The compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide in order to
38 give final concentrations equal to 20µg/mL, 2µg/mL, 0.2µg/mL, 0.02µg/mL and
39 0.002µg/mL. The eggs used in the EHA were obtained from parasites removed
40 from the liver of cattle, which were discarded from slaughterhouses after sanitary
41 inspection. The results of EHA, conducted in triplicate, showed that compounds
42 tested (**1a-h**) do not exhibit ovicidal activity against *F. hepatica* eggs. In the series
43 with the compounds (**2a-h**) exhibited some ovicidal activity, especially to
44 compounds **2b** and **2e**. Compound **2b** showed high efficacy (91±1%) and good cell
45 viability (96%), in the concentration of 2µg/ml. With compound **2e** there was also a
46 high efficiency (96%), especially the concentrations 0.2µg/mL, 0.02µg/mL and
47 0.002µg/mL, which showed cell viability (~92%). These preliminary results will
48 guide structural changes for production and study of new molecules able to act
49 with anthelmintics.

Keywords: *Fasciola hepatica*; fasciolicide; thiazolidinones; eggs hatching assay

1. Introduction

Compounds derived from thiazolidin-4-ones present great scientific interest because of its chemical and biological properties (Jain et al., 2012; Liesen et al., 2008; Tripathi et al., 2014). Some of their biological activities can be cited as: **anti-HIV**(Chen et al., 2011); **inhibitors of the hepatitis C virus** (Rawal et al., 2008); **anti bacterial biofilms**(Rane et al., 2012); **aldose reductase inhibitors**(Ottanà et al., 2011); **antifibrotic**(Kaminsky et al., 2016); **anti-inflammatory**(Deep et al., 2012); **antitumor and antimycobacterial** (Güzel and Salman, 2006); **antioxidant** (Júnior et al., 2013); **antiprotozoal**(de Oliveira Filho et al., 2015), **antifungal**(Kunzler et al., 2013; Marques et al., 2014; Secci et al., 2016), **antitumor**(Güzel and Salman, 2006); **antiviral**(Manvar et al., 2016), **anti *Mycobacterium tuberculosis***(Vintonyak et al., 2011).

Although there is a variety biological activity reports of compounds derived from thiazolidin-4-ones, to the best of our knowledge there is no study reporting ovicidal activity against trematodes, in specific for *Fasciola hepatica*.

The helminth *F. hepatica* belongs to Trematoda class and Fasciolidae Family is the parasite that causes fascioliasis, a parasitic disease that affects both animals and humans (Mas-Coma et al., 2009). In animals this disease causes anemia, abortion, progressive loss of physical and developmental conditions causing loss of milk and beef productivity. The estimated global annual loss of three billion dollars(Aleixo et al., 2015; Oakley et al., 1979).

Drugs used to control the fluke are fasciolicidas which act in one or more steps of the trematode (Fairweather and Boray, 1999). They include halogenated phenols, salicylanilides, benzimidazoles, sulphonamides and phenoxyalkanes classes (Fairweather and Boray, 1999). In humans fascioliasis is mainly treated with these drugs : triclabendazole (benzimidazole) and bithionol (halogenated phenol) (Chen et al., 2013; Couturier et al., 1999; Ramachandran et al., 2012).

However, *F. hepatica* fasciolicidas resistance in animals already has been reported since the 1980s (Boray and Bono, 1989). Current work on resistance in animals can be cited: Spain (Alvarez-Sánchez et al., 2006), Argentina (Olaechea et al., 2011; Sanabria et al., 2013), United Kingdom (Canevari et al., 2013), Peru (Ortiz et al., 2013) e Northern Ireland (Hanna et al., 2015). Thus, there are cases of fasciolosis resistance with triclabendazole in humans (Gil et al., 2014).

The thiazolidin-4-ones have a point in common with thiabendazole, the presence of a heterocyclic thiazole in its chemical structure and due to the large reporting activities performed by other biological compounds derived from thiazolidin-4-ones it is possible that new compounds also show fasciolicide action.

As such, this study evaluates the anthelmintic action (ovicidal) *in vitro*, using the eggs hatching assay (EHA), and cytotoxicity *in vitro* by evaluating the metabolic function of mitochondrial dehydrogenase activity in two systematic series of derivatives of thiazolidine-4-ones against *F. hepatica* eggs: 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones (**1a-h**) (Gouvea et al., 2016) and 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones (**2a-h**) (unpublished data).

2. Materials and methods.

97 2.1. Obtaining of the compounds.

98 The compounds were synthesized and characterized by the research group
99 of Applied Chemistry Laboratory Bioactive, Federal University of Pelotas, in
100 accordance with its standard procedures, described in previous work(Gouvea et
101 al., 2016).

102 The tested compounds were solubilized in DMSO in order to obtain a stock
103 solution concentration of 20000µg/mL. The stock solution was diluted in
104 concentrations of 4000 µg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml and 0.4 µg/ml in
105 different tubes.

106 2.2. Obtainment of the *F. hepatica* eggs

107 Livers infected with fascioliasis were obtained in slaughterhouses located in
108 the city of Pelotas of Rio Grande do Sul - Brazil. Faced with the permission
109 conceded by the managers, the pieces were obtained from disposals, directly after
110 sanitary inspection. The samples were stored in labeled plastic bags and sent to
111 the Parasitology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology
112 Institute of Biology of the Federal University of Pelotas, where they were
113 processed. The *F. hepatica* removal process was conducted through cuts in the
114 bile ducts and in the tissue of infected livers.

115 The living parasites were directly collected and stored in glass vials
116 containing warm saline solution (approximately 30°C).After three hours, the
117 parasites were removed and the solution containing the eggs, was transferred to a
118 beaker for sedimentation. The eggs were washed three times with distilled water,
119 and filtered the suspension always a set of four sieve (100, 170, 200 and 250
120 mesh). Directly after that, they were stored in glass containers, properly identified,

containing sterile distilled water and were kept refrigerated until preparation of hatching test (Ueno and Gonçalves, 1998).

2.3. EHA

The EHA of *F. hepatica* were performed based on recently described methodologies (Arafa et al., 2015; Robles-Pérez et al., 2014). Tests were conducted in triplicate plates using a six-well flat bottom cell culture (Marck KASVI, model K12-006). In addition, the test compounds were performed with positive test using the drug Thiabendazole 25µg/mL (Vet Pharma - Handling of Pharmacy RS-Brazil), the negative test containing only distilled water and the suspension egg and control with dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 30 µL of the same 4.970mL in sterile distilled water and the suspension eggs.

In different flasks containing 4.970mL of sterile distilled water were added 30µL of each compound dilution and, after homogenization transferred to the plates. To this was added 1 mL volume egg suspension containing approximately 100 eggs. This yields the final concentrations of the compounds of 0.002 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.2 µg/mL, 2.0 µg/mL and 20 µg/mL.

Subsequently the plates were incubated at 28°C with higher relative humidity at 80% in Greenhouse Incubator Type B.O.D. (Eletrolab brand, model EL 101/03) in a dark environment for 14 days. On the fourteenth day of incubation the plates were exposed to light for 2 h, to stimulate the emergence of miracidium (Arafa et al., 2015; Robles-Pérez et al., 2014).

The counting of hatched and total eggs was held in inverted microscope (Brand: Olympus - CKX 41). The results of each treatment were expressed as a percentage using the following formulas:

145

$$146 \quad (a) \quad \text{Percentage of hatching} = \frac{\text{Number of hatched eggs}}{\text{Total number of eggs}} \times 100$$

147

$$148 \quad (b) \quad \text{Hatching ratio} = \frac{\% \text{ hatching of each concentration}}{\% \text{ hatching of control}} \times 100$$

149 The percentage of hatched eggs was used to calculate the efficiency of the
 150 compounds. To compare the hatching of different EHA, the hatching ratio was
 151 calculated for each concentration. The percentage efficacy (%E) for each tested
 152 concentration against *F. hepatica* eggs was evaluated by the following formula
 153 (Wood et al., 1995):

154

$$155 \quad (c) \quad \%E = \frac{\% \text{ hatched of eggs in control} - \% \text{ hatched eggs in treatment}}{\% \text{ hatched of eggs in control}} \times 100$$

156

157 2.4. Citotoxicity assay

158 2.4.1. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Culture

159 The cell line was maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM)
 160 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics and incubated at
 161 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

162 2.4.2. MTT cell viability assay

163 To assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity
 164 was used 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
 165 (MTT)(Mosmann, 1983). MDCK cells were cultured in microplates for 24 hours in a
 166 CO₂ chamber at 37°C up to the confluence. The tested molecules were initially

solubilized in DMSO and subsequently diluted in MEM resulting in 0.002 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.2 µg/mL, 2.0 µg/mL e 20 µg/mL. A cell control without adding molecules was maintained.

Cytotoxicity was assessed 48 hours after exposure to different concentrations of the molecules of the cells. After this period, the solution containing the molecule was aspirated and added to 50 mL/well of MTT (1mg/ml) in each well and the plates were maintained in a CO₂ chamber for 4h. MTT was discarded and added to 50mL/well of ethyl alcohol and the plates returned to the CO₂ chamber for another 10 minutes for subsequent reading. Absorption was determined spectrophotometrically at 540nm. All tests were performed in duplicate(ISO/EN10993-5, 2009).

2.5. Statistical Analysis

A one-way analysis of variance was used to evaluate differences among the different treated groups. The multiple Dunnett comparison test was conducted to confirm significant differences between the different groups with the control. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The data were analyzed using GraphPad PRISM ®.

3. Results

3.1. EHA

In both the negative control and control with DMSO, in the seventh day of incubation was observed the cell division stage (morula). Approximately in the eleventh day, the embryonated eggs was observed, ie, the formation of miracidium. After light exposure, on the fourteenth day, the eggs with the open operculum were observed indicating the output egg miracidium (Fig. 1).

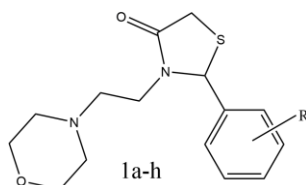


Fig 1. Different developmental stages of *Fasciola hepatica* eggs in the negative control: (A) eggs at day zero of incubation. (B) morula stage or cell division observed the seventh day of incubation. (C) embryonated eggs or with miracidium, observed the fourteenth day. (D) Moment of egg hatching, output of miracidium. (E) miracidium. (F) egg after hatching with open operculum. Image magnification x150.

The eggs used in the EHA were sensitive to Thiabendazole (25 $\mu\text{g/mL}$) (positive control) with an average inhibition rate development of $100\pm 0\%$. In the negative control and control with DMSO was obtained the same average percentage as the hatching $71\pm 5\%$ e $70\pm 7\%$, respectively.

The **1a-h** compounds presented no significant difference ($p < 0.05$) between the different concentrations tested and the negative control (Table 1). The efficacy of the compounds **1a-h**, in the great majority, was zero and the highest efficiency ($45\pm 6\%$) of compound **1h** was in the concentration $20\mu\text{g/mL}$.

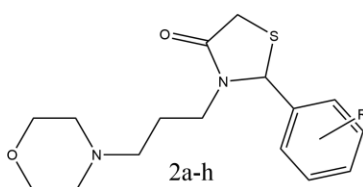
Table 1. Average hatching ratios of *Fasciola hepatica* eggs from compounds **1a-h** in different concentrations tested.



Comp.	R	Hatching ratio $\pm$ S.D.				
		Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (%)				
		20	2	0.2	0.02	0.002
1a	2-F	110 $\pm$ 5 ^{ns}	112 $\pm$ 6 ^{ns}	108 $\pm$ 6 ^{ns}	114 $\pm$ 8 ^{ns}	116 $\pm$ 7 ^{ns}
1b	2,4-F	114 $\pm$ 5 ^{ns}	112 $\pm$ 3 ^{ns}	117 $\pm$ 3 ^{ns}	132 $\pm$ 3 ^{**}	124 $\pm$ 8 [*]
1c	2,4-Cl	76 $\pm$ 2 ^{***}	79 $\pm$ 4 ^{***}	96 $\pm$ 2 ^{ns}	95 $\pm$ 7 ^{ns}	102 $\pm$ 8 ^{ns}
1d	2,6-Cl	95 $\pm$ 5 ^{ns}	98 $\pm$ 2 ^{ns}	97 $\pm$ 9 ^{ns}	101 $\pm$ 2 ^{ns}	98 $\pm$ 5 ^{ns}
1e	4-Cl	93 $\pm$ 7 ^{ns}	91 $\pm$ 7 ^{ns}	88 $\pm$ 8 [*]	96 $\pm$ 2 ^{ns}	100 $\pm$ 5 ^{ns}
1f	4-NO ₂	89 $\pm$ 1 ^{***}	81 $\pm$ 3 ^{***}	92 $\pm$ 1 ^{**}	97 $\pm$ 2 ^{ns}	102 $\pm$ 2 ^{ns}
1g	4-OCH ₃	94 $\pm$ 4 ^{ns}	96 $\pm$ 3 ^{ns}	90 $\pm$ 3 ^{**}	100 $\pm$ 5 ^{ns}	74 $\pm$ 2 ^{***}
1h	2-F;6-Cl	55 $\pm$ 5 ^{***}	54 $\pm$ 5 ^{***}	73 $\pm$ 6 ^{***}	75 $\pm$ 9 ^{**}	63 $\pm$ 12 ^{***}

Significant differences between the control group and the treated group are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Dunett's test.

211 Table 2 shows the hatching ratios of compounds **2a-h**, compared to
 212 negative control group, all tested concentrations showed significant differences (p
 213 < 0.05).
 214 **Table 2.** Average hatching ratios of *Fasciola hepatica* eggs and the percentage
 215 efficiency of compounds **2a-h** in different concentrations tested.



Comp.	R	Hatching ratio $\pm$ S.D					Efficiency				
		Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (%)					Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (%)				
		20	2	0.2	0.02	0.002	20	2	0.2	0.02	0.002
2a	4-F	53 $\pm$ 8 ^{***}	64 $\pm$ 3 ^{***}	47 $\pm$ 1 ^{***}	60 $\pm$ 4 ^{***}	57 $\pm$ 2 ^{***}	46 $\pm$ 10	36 $\pm$ 5	53 $\pm$ 2	40 $\pm$ 4	43 $\pm$ 2
2b	2,4-F	5 $\pm$ 2 ^{***}	9 $\pm$ 3 ^{***}	4 $\pm$ 1 ^{***}	9 $\pm$ 1 ^{***}	21 $\pm$ 1 ^{***}	95 $\pm$ 2	91 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	79 $\pm$ 1
2c	2,4-Cl	81 $\pm$ 2 ^{**}	73 $\pm$ 6 ^{***}	81 $\pm$ 4 ^{**}	85 $\pm$ 9 [*]	84 $\pm$ 9 ^{**}	48 $\pm$ 4	52 $\pm$ 6	43 $\pm$ 4	29 $\pm$ 5	35 $\pm$ 8
2d	2,6-Cl	35 $\pm$ 13 ^{***}	34 $\pm$ 5 ^{***}	44 $\pm$ 3 ^{***}	55 $\pm$ 6 ^{***}	29 $\pm$ 5 ^{***}	65 $\pm$ 12	66 $\pm$ 6	56 $\pm$ 3	45 $\pm$ 6	71 $\pm$ 5
2e	4-Cl	2 $\pm$ 1 ^{***}	3 $\pm$ 1 ^{***}	4 $\pm$ 2 ^{***}	6 $\pm$ 1 ^{***}	4 $\pm$ 1 ^{***}	98 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1
2f	4-NO ₂	14 $\pm$ 8 ^{***}	40 $\pm$ 3 ^{***}	41 $\pm$ 5 ^{***}	30 $\pm$ 1 ^{***}	13 $\pm$ 2 ^{***}	86 $\pm$ 8	60 $\pm$ 3	59 $\pm$ 5	70 $\pm$ 1	87 $\pm$ 2
2g	4-OCH ₃	83 $\pm$ 7 ^{***}	77 $\pm$ 3 ^{***}	66 $\pm$ 2 ^{***}	65 $\pm$ 1 ^{***}	48 $\pm$ 1 ^{***}	17 $\pm$ 7	23 $\pm$ 3	34 $\pm$ 2	35 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1
2h	2-OCH ₃	12 $\pm$ 2 ^{***}	15 $\pm$ 3 ^{***}	40 $\pm$ 6 ^{***}	11 $\pm$ 3 ^{***}	22 $\pm$ 2 ^{***}	88 $\pm$ 2	85 $\pm$ 4	60 $\pm$ 6	89 $\pm$ 3	78 $\pm$ 10

Significant differences between the control group and the treated group are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Dunett's test.

It was observed in tests (EJA) with the compounds of **2a-h** series, when hatching occurred, the miracidium had low mobility and their movement was slower compared to miracidium EHA negative control group. The EHA of compound **2d** showed that eggs had hatched their semi miracidium (Fig. 2a) or when fully hatched the same, it was easy to capture them next to the egg (Fig. 2b).

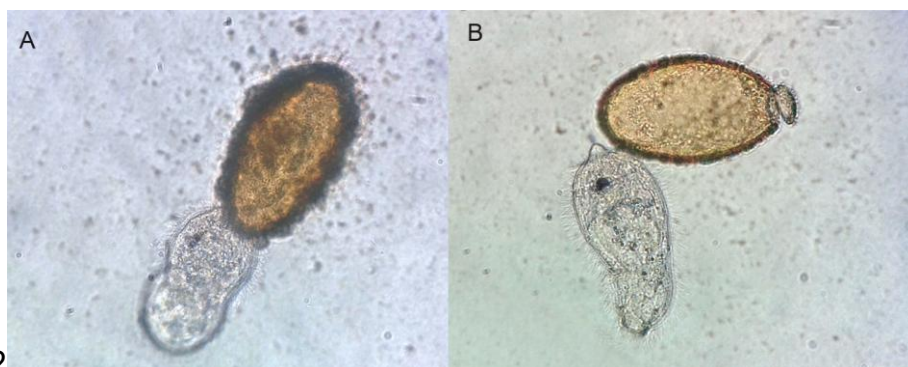


Fig. 2. *Fasciola hepatica* eggs hatched the eggs hatching essays with the compound **2d**. (A) Eggs with their semi miracidium hatched. (B) egg hatched miracidium with his beside. Image magnification x200.

3.2. Cytotoxicity

The front cytotoxicity tests of different compounds (**1a-h** and **2a-h**) are shown in Table 3. Results are expressed in percentage of cell viability *in vitro* in MDBK cells in different concentrations (20 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$ and 0.002 $\mu\text{g/mL}$).

Table 3. Cytotoxicity of compounds **1a-h** and **2a-h**.

Comp.	R	Cytotoxicity					Comp.	R	Cytotoxicity				
		Cell viability (μg.mL-1) (%)							Cell viability (μg.mL-1) (%)				
		20	2	0.2	0.02	0.002			20	2	0.2	0.02	0.002
1a	2-F	62	80	89	98	93	2a	4-F	92	128	132	139	140
1b	2,4-F	55	75	88	92	90	2b	2,4-F	60	93	100	104	111
1c	2,4-Cl	21	68	76	87	93	2c	2,4-Cl	5	38	64	84	101
1d	2,6-Cl	2	12	48	73	89	2d	2,6-Cl	40	83	96	95	105
1e	4-Cl	76	89	91	91	96	2e	4-Cl	61	79	91	92	92
1f	4-NO ₂	87	100	100	100	100	2f	4-NO ₂	62	95	105	105	121

1g	4-OCH ₃	83	97	97	97	100	2g	4-OCH ₃	86	117	134	136	143
1h	2-F;6-Cl	70	80	80	83	90	2h	2-OCH ₃	84	92	103	101	106

232

233 **4. Discussion**

234 The observations obtained in the EHA of DMSO negative control and for the
 235 embryonic development of *F. hepatica* eggs corroborate those described by Arafa
 236 et al (2015). The use of DMSO as solvent to a final concentration of 0.5% did not
 237 affect the viability of the eggs, since there were no statistically significant
 238 difference in the development of the eggs between the negative control and the
 239 DMSO control. This observation is consistent with a previous study in vitro with
 240 Triclabendazole drug(Fairweather et al., 2012).

241 Because the compounds **1a-h** did not present a significant
 242 difference($p < 0,05$) in the hatching relationships in regard with the negative control,
 243 it can be induced that these compounds do not affect viability of the *F. hepatica*
 244 eggs. These compounds may not possess chemical properties, such as
 245 lipophilicity, necessary to penetrate the of the *F. hepatica* eggs. Previous works
 246 suggests that inhibition of hatching depends on the hydrophobic nature of the drug
 247 and also, the highest activity correlates with a high solubility in lipids(Lacey, 1988).

248 The compounds 2a-h demonstrated ability to penetrate the egg *F. hepatica*
 249 since there was significant difference in hatching treatment compared with the
 250 negative control. This fact may be related to the lipophilicity of the tested
 251 compounds, where the **2a-h** compounds are more lipophilic than compounds **1a-h**.
 252 Mottier et al.(2003) has reported that the lipophilicity of the drug albendazole can
 253 facilitate the penetration of parasitic helminthes eggs.

The fact of the decreased mobility of miracidium after hatching and the case where the miracidium not came out totally egg occurred in the **2a-h** compounds, both have been reported in research Oxyclozanide drug. Trials with this drug show that it is a highly effective compound for the treatment of fascioliasis *in vivo* tests, but *in vitro* studies do not affect the development of eggs(Arafa et al., 2015). Thus, while not presenting excellent results as ovicidal, compound **2d** (Fig. 1) can produce good results in *in vivo* assays, as shown *in vitro* activity against the larval form (miracidium).

For **2a-h** compounds showed a reduction in hatchability of eggs so that can explain their efficacy. According to World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Wood et al., 1995), the efficacy of a drug can be classified against each genus/species (larvae/adults) according to the percentage reduction of larval and / or adult forms of the parasite in: highly efficient (over 98%), effective (90-98%), moderately effective (80-89%) or insufficiently active (less than 80%).

In this manner, compound **2b** can be classified as effective at four concentrations (0.02 µg/mL, 0.2 µg/mL, 2 µg/mL and 20 µg/mL), compound **2e** can be rated effective at all concentrations tested. In the compound **2b** better efficacy ($95 \pm 2\%$) in the concentration was 20 µg/mL, followed efficiency ($91\% \pm 1$) at a concentration 2 µg/mL. However, the cytotoxicity assay at a concentration of 20 µg/ml showed cellviability 60% (which may characterizing a toxic compound at this concentration) and the concentration 2 µg/mL and cell viability was 93%.Thus, considering cell viability and effectiveness the most promising concentration of compound **2b** is 2 µg/mL, where there is a high efficacy ($91 \pm 1\%$) and good cell viability (96%).

Compound **2e** with all tested concentrations can be considered effective, with an average 96% efficiency, and there was no significant differences ($p < 0.05$) between them. However, at concentrations of 20 $\mu\text{g/mL}$ and 2 $\mu\text{g/mL}$ showed cell viability of 61% and 79%, respectively, and in the different concentrations of 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$, 0.002 $\mu\text{g/mL}$, cellular viability was 91 %, 92% and 92%, respectively. Therefore, the most promising cytotoxic concentrations of compound **2e** are 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$ and 0.002 $\mu\text{g/mL}$, which can be classified as efficacious (WAAVP) and showed good cell viability.

3. Conclusions

Based on the results of the EHA can be concluded that compounds **1a-h** show no ovicidal activity against *F. hepatica* eggs. In the series with the **2a-h** compounds showed some ovicidal activity, especially to compounds **2b** and **2e**, which showed a considerable reduction in the hatching *F. hepatica* eggs. Considering the effectiveness of classification according WAAVP and cytotoxicity tests, it is concluded that compounds **2b** and **2e** presented the best results. In addition to presenting a great potential ovicidal *in vitro* against *F. hepatica* eggs, they also exhibited a good *in vitro* cell viability in MDBK, suggesting continuing studies with these compounds and other derivatives of thiazolidinones.

Competing interests

The authors declare that there are no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank UFPel, CNPq and CAPES for support for this study.

References

- 302 Aleixo, M.A., Freitas, D.F., Dutra, L.H., Malone, J., Martins, I.V.F., Molento, M.B.,
303 2015. *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use
304 of geoprocessing systems for prevalence studies. *Semin. Ciências Agrárias* 36,
305 1451-1465. doi:10.5433/1679-0359.2015v36n3p1451
- 306 Alvarez-Sánchez, M. a, Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J., Rojo-Vázquez, F. a,
307 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in
308 sheep in Spain. *Vet. Rec.* 159, 424-425. doi:10.1136/vr.159.13.424
- 309 Arafa, W.M., Shokeir, K.M., Khateib, A.M., 2015. Comparing an in vivo egg
310 reduction test and in vitro egg hatching assay for different anthelmintics against
311 *Fasciola* species , in cattle. *Vet. Parasitol.* 214, 152-158.
312 doi:10.1016/j.vetpar.2015.09.023
- 313 Boray, J.C., Bono, B. De, 1989. Drug resistance in *Fasciola hepatica*, in:
314 Outteridge, P.M., Richards, R.D. (Eds.), *Advances in Veterinary Science*. The
315 Australian Veterinary Association, Artarmon , Austrália, pp. 166-169.
- 316 Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P.,
317 Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L., 2013. Testing
318 albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with
319 isolates from South America and the United Kingdom. *J. Helminthol.* 1-7.
320 doi:10.1017/S0022149X13000163
- 321 Chen, H., Guo, Z., Yin, Q., Duan, X., Gu, Y., Li, X., 2011. Design, synthesis and
322 HIV-RT inhibitory activity of novel thiazolidin-4-one derivatives. *Front. Chem. Eng.*
323 *China* 5, 231-237. doi:10.1007/s11705-010-1022-7
- 324 Chen, J.X., Chen, M.X., Ai, L., Xu, X.N., Jiao, J.M., Zhu, T.J., Su, H.Y., Zang, W.,
325 Luo, J.J., Guo, Y.H., Lv, S., Zhou, X.N., 2013. An Outbreak of Human Fascioliasis

- 326 *gigantica* in Southwest China. PLoS One 8, 1-10.
 327 doi:10.1371/journal.pone.0071520
- 328 Couturier, F., Hiar, I., Hansmann, Y., Christmann, D., 1999. Place du
 329 triclabendazole dans le traitement des fascioloses hépatiques. Médecine Mal.
 330 Infect. 29, 753-757.
- 331 de Oliveira Filho, G.B., de Oliveira Cardoso, M.V., Espíndola, J.W.P., Ferreira,
 332 L.F.G.R., de Simone, C.A., Ferreira, R.S., Coelho, P.L., Meira, C.S., Moreira,
 333 D.R.M., Soares, M.B.P., Leite, A.C.L., 2015. Structural design, synthesis and
 334 pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*.
 335 Bioorg. Med. Chem. 23, 7478-7486.
 336 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.048
- 337 Deep, A., Jain, S., Sharma, P.C., Phogat, P., Malhotra, M., 2012. Synthesis of 2-
 338 (aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and anti-
 339 inflammatory activity. Med. Chem. Res. 21, 1652-1659. doi:10.1007/s00044-011-
 340 9679-0
- 341 Fairweather, I., Boray, J.C., 1999. Fasciolicides: Efficacy , Actions , Resistance
 342 and its. Vet. J. 158, 81-112.
- 343 Fairweather, I., McShane, D.D., Shaw, L., Ellison, S.E., O'Hagan, N.T., York, E.A.,
 344 Trudgett, A., Brennan, G.P., 2012. Development of an egg hatch assay for the
 345 diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. Vet.
 346 Parasitol. 183, 249-259. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.023
- 347 Gil, L.C., Díaz, A., Rueda, C., Martínez, C., Castillo, D., Apt, W., 2014. Fascioliasis
 348 hepatica humana: Resistencia al tratamiento con triclabendazol. Rev. Med. Chil.
 349 142, 1330-1333. doi:10.4067/S0034-98872014001000014

- 350 Gouvea, D.P., Vasconcellos, F.A., dos Anjos Berwaldt, G., Neto, A.C.P.S.,
351 Fischer, G., Sakata, R.P., Almeida, W.P., Cunico, W., 2016. 2-Aryl-3-(2-
352 morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones: Synthesis, anti-inflammatory in vivo,
353 cytotoxicity in vitro and molecular docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* 118, 259-
354 265. doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.028
- 355 Güzel, Ö., Salman, A., 2006. Synthesis and biological evaluation of new 5-methyl-
356 N-(3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]-dec-4-yl)-3-phenyl-1H-indole-2-carboxamide
357 derivatives. *Arkivoc* 2006, 849-857. doi:10.3998/ark.5550190.0007.c12
- 358 Hanna, R.E.B., McMahon, C., Ellison, S., Edgar, H.W., Kajugu, P.E., Gordon, A.,
359 Irwin, D., Barley, J.P., Malone, F.E., Brennan, G.P., Fairweather, I., 2015. *Fasciola*
360 *hepatica*: A comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole,
361 nitroxylin and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern
362 Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology.
363 *Vet. Parasitol.* 207, 34-43. doi:10.1016/j.vetpar.2014.11.016
- 364 ISO/EN10993-5, 2009. B. Int. Stand. ISO 10993-5 Biol. Eval. Med. devices - Part 5
365 Tests Cytotox. *Vitr. methods* 3 Ed, 42.
- 366 Jain, A.K., Vaidya, A., Ravichandran, V., Kashaw, S.K., Agrawal, R.K., 2012.
367 Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A
368 review. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 3378-3395. doi:10.1016/j.bmc.2012.03.069
- 369 Júnior, J.C.C., Gouvêa, D.P., Ribeiro, C. da S., Dutra, F.S.P., Stefanello, F.M.,
370 Pereira, C.M.P., Cunico, W., Siqueira, G.M., 2013. Efficient Synthesis and
371 Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. *J. Biochem*
372 *Mol. Toxicol.* 26, 445-450.
- 373 Kaminsky, D., den Hartog, G.J.M., Wojtyra, M., Lelyukh, M., Gzella, A., Bast, A.,

- 374 Lesyk, R., 2016. Antifibrotic and anticancer action of 5-ene
375 amino/iminothiazolidinones. Eur. J. Med. Chem. 112, 180-195.
376 doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.011
- 377 Kunzler, A., Neuenfeldt, P.D., das Neves, A.M., Pereira, C.M.P., Marques, G.H.,
378 Nascente, P.S., Fernandes, M.H. V, Hübner, S.O., Cunico, W., 2013. Synthesis,
379 antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones.
380 Eur. J. Med. Chem. 64, 74-80. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.030
- 381 Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action
382 and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. Int. J. Parasitol. 18, 885-
383 936.
- 384 Liesen, A.P., Aquino, T.M. de, Góes, A.J.S., Lima, J.G. de, Faria, A.R. de, Alves,
385 A.J., 2008. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-
386 tiazolidinonas 31, 369-376.
- 387 Manvar, D., Küçükgülzel, I., Erensoy, G., Tatar, E., Deryabaşoğlu, G., Reddy,
388 H., Talele, T.T., Cevik, O., Kaushik-Basu, N., 2016. Discovery of conjugated
389 thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors.
390 Biochem. Biophys. Res. Commun. 469, 743-747. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.042
- 391 Marques, G.H., Kunzler, A., Bareño, V.D.O., Drawanz, B.B., Mastelloto, H.G.,
392 Leite, F.R.M., Nascimento, G.G., Nascente, P.S., Siqueira, G.M., Cunico, W.,
393 2014. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives.
394 Med. Chem. 10, 355-360. doi:10.2174/15734064113099990030
- 395 Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids
396 and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission,
397 Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. Adv.

- 398 Parasitol. 69, 41-146. doi:10.1016/S0065-308X(09)69002-3
- 399 Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
400 Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-
401 63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- 402 Mottier, M.L., Alvarez, L.I., Pis, M.A., Lanusse, C.E., 2003. Transtegumental
403 diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: Correlation with
404 their octanol-water partition coefficients. Exp. Parasitol. 103, 1-7.
405 doi:10.1016/S0014-4894(03)00060-2
- 406 Oakley, G.A., Owen, B., Knapp, N.H., 1979. Production effects of subclinical liver
407 flukes infection in growing dairu heifers. Vet. Rec. 104, 503-507.
- 408 Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R., 2011. Resistance of
409 *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). Vet.
410 Parasitol. 178, 364-366. doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.047
- 411 Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M.,
412 Lamenza, P., Solana, H., 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against
413 Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy
414 test in sheep. Vet. Parasitol. 195, 118-121. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.001
- 415 Ottanà, R., MacCari, R., Giglio, M., Del Corso, A., Cappiello, M., Mura, U.,
416 Cosconati, S., Marinelli, L., Novellino, E., Sartini, S., La Motta, C., Da Settimo, F.,
417 2011. Identification of 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives endowed with dual
418 activity as aldose reductase inhibitors and antioxidant agents for the treatment of
419 diabetic complications. Eur. J. Med. Chem. 46, 2797-2806.
420 doi:10.1016/j.ejmech.2011.03.068

- 421 Ramachandran, J., Ajjampur, S.S.R., Chandramohan, A., Varghese, G.M., 2012.
422 Cases of human fascioliasis in India: tip of the iceberg. *J. Postgrad. Med.* 58, 150-
423 152. doi:10.4103/0022-3859.97180
- 424 Rane, R.A., Sahu, N.U., Shah, C.P., 2012. Synthesis and antibiofilm activity of
425 marine natural product-based 4-thiazolidinones derivatives. *Bioorganic Med.*
426 *Chem. Lett.* 22, 7131-7134. doi:10.1016/j.bmcl.2012.09.073
- 427 Rawal, R.K., Katti, S.B., Kaushik-basu, N., Arora, P., Pan, Z., 2008. Non-
428 nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B RNA-dependant RNA
429 polymerase: 2-Aryl-3-heteroaryl-1, 3-thiazolidin-4-one derivatives. *Bioorg. Med.*
430 *Chem. Lett.* 18, 6110-6114. doi:10.1016/j.bmcl.2008.10.023
- 431 Robles-Pérez, D., Martínez-pérez, J.M., Rojo-vázquez, F.A., 2014. Development
432 of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole
433 in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet. Parasitol.* 203, 217-221.
434 doi:10.1016/j.vetpar.2013.11.020
- 435 Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C., Alvarez, L., 2013.
436 Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and
437 susceptible to triclabendazole. *Vet. Parasitol.* 193, 105-110.
438 doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.033
- 439 Secci, D., Carradori, S., Bizzarri, B., Chimenti, P., De Monte, C., Mollica, A.,
440 Rivanera, D., Zicari, A., Mari, E., Zengin, G., Aktumsek, A., 2016. Novel 1,3-
441 thiazolidin-4-one derivatives as promising anti-Candida agents endowed with anti-
442 oxidant and chelating properties. *Eur. J. Med. Chem.* 117, 144-156.
443 doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.012
- 444 Tripathi, A.C., Gupta, S.J., Fatima, G.N., Sonar, P.K., Verma, A., Saraf, S.K.,

- 445 2014. 4-Thiazolidinones: The advances continue. *Eur. J. Med. Chem.* 72, 52-77.
446 doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.017
- 447 Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de
448 ruminantes, 4th ed. Japan International Cooperation Agency, Tokyo.
- 449 Vintonyak, V. V., Warburg, K., Over, B., H??bel, K., Rauh, D., Waldmann, H.,
450 2011. Identification and further development of thiazolidinones spiro-fused to
451 indolin-2-ones as potent and selective inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*
452 protein tyrosine phosphatase B. *Tetrahedron* 67, 6713-6729.
453 doi:10.1016/j.tet.2011.04.026
- 454 Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B.,
455 Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J.,
456 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology
457 (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of
458 anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181-213.
459 doi:10.1016/0304-4017(95)00806-2
- 460

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

Os compostos 2-aril-3-(2-morfolinopropil) tiazolidin-4-onas apresentaram resultados promissores contra o desenvolvimento dos ovos de *F. hepatica*, em contra partida os compostos 2-aril-3-(2-morfolinoetil) tiazolidin-4-onas não apresentam ação ovicida contra ovos de *F. hepatica*.

Os derivados 2-aril-3-(2-morfolinopropil) tiazolidin-4-onas (aril = C₆H₄-2,4-F; C₆H₄-4-Cl; C₆H₄-4-NO₂ e C₆H₄-2-OCH₃) apresentaram uma redução média na eclodibilidade dos ovos de *F. hepatica* de 95% (aril = C₆H₄-4-F), 98% (aril = C₆H₄-4-Cl), 86% (aril = C₆H₄-4-NO₂) e 88% (aril = C₆H₄-2-OCH₃). Nestes compostos pode-se inferir a classificação de acordo com o WAAVP, e a melhor concentração ovicida, sendo considerados eficazes [aril = C₆H₄-2,4-F (20µg/mL, 2µg/mL, 0,2µg/mL e 0,02µg/mL) e os compostos [aril = C₆H₄-4-Cl (0,2µg/mL, 0,02µg/mL e 0,002 µg/mL)].

Os compostos (**2b** e **2e**) que apresentaram boa ação ovicida, considerados eficazes, apresentaram boas viabilidades celulares (91% a 93%). Em alguns casos a viabilidade celular foi baixa (62%), fato que ocorreu com o composto **2f** de aril = C₆H₄-4-NO₂.

Obtiveram-se resultados promissores que legitimam a continuação de novos estudos, a fim de se obter compostos capazes de agirem como agentes anti-helmínticos contra *F. hepatica*.

REFERÊNCIAS

- ADRIEN, M. D. L.; SCHILD, A. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; et al. Acute fasciolosis in cattle in southern brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 705-709, 2013.
- ALEIXO, M. A.; FREITAS, D. F.; DUTRA, L. H.; et al. *Fasciola hepatica*: epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1451-1465, 2015.
- ALMEIDA, M. Â. O. DE; AYRES, M. C. C. Agentes Anticestódeos e Antitrematódeos. In: H. de S. Spinosa; S. L. Górniak; M. M. Bernardi (Eds.); **Farmacologia Veterinária Aplicada a Medicina Veterinária**. 5th ed., p.527-534, 2014a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- ALMEIDA, M. Â. O. DE; AYRES, M. C. C. Considerações gerais sobre anti-helmínticos. In: H. de S. Spinosa; S. L. Górniak; M. M. Bernardi (Eds.); **Farmacologia Veterinária Aplicada a Medicina Veterinária**. 5th ed., p.519-526, 2014b. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. A; MAINAR-JAIME, R. C.; PÉREZ-GARCÍA, J.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. **The Veterinary record**, v. 159, n. 13, p. 424-425, 2006.
- ANDREANI, L. H.; MARTINS, C. E. N.; LEMFERS, T. REGINA; et al. Prevalência de fasciolose hepática no descarte de vísceras no estado de Santa Catarina. **Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar**, 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A Origem dos Fármacos. In: E. J. Barreiro; C. A. M. Fraga (Eds.); **Química Medicinal: As bases moleculares de ação dos fármacos**. p.71-135, 2008. Porto Alegre: Artmed.
- BENNEMA, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; MOLENTO, M. B.; MEDEIROS, C.; CARVALHO, O. DOS S. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014.
- BORAY, J. C. Experimental fascioliasis in Australia. **Advances in Parasitology**, v. 7, p. 195-210, 1969.
- BORAY, J. C.; BONO, B. DE. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: P. M. Outteridge; R. D. Richards (Eds.); **Advances in Veterinary Science**. p.166-169, 1989. Artarmon , Austrália: The Australian Veterinary Association.
- CANEVARI, J.; CEBALLOS, L.; SANABRIA, R.; et al. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. **Journal of helminthology**, p. 1-7, 2013.

CHEN, H.; GUO, Z.; YIN, Q.; et al. Design, synthesis and HIV-RT inhibitory activity of novel thiazolidin-4-one derivatives. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 5, n. 2, p. 231-237, 2011.

CHEN, J. X.; CHEN, M. X.; AI, L.; et al. An Outbreak of Human Fascioliasis gigantea in Southwest China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-10, 2013.

CORAL, R. P.; MASTALIR, E. T.; MASTALIR, F. P. Retirada de *Fasciola hepatica* da via biliar principal por coledocoscopia. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, p. 69-71, 2007.

COUTURIER, F.; HIAR, I.; HANSMANN, Y.; CHRISTMANN, D. Place du triclabendazole dans le traitement des fascioloses hépatiques. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 29, n. 12, p. 753-757, 1999.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; JR., W. T. V. Chemistry and Biological Activities of 1,3-Thiazolidin-4-ones. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 5, n. 21, p. 336-344, 2008.

DAWES, B. Experimental fascioliasis: some effects on *Fasciola hepatica* of treatment of rat hosts with bithionol ("Actamer"). **Helminthologia**, , n. 7, p. 297-307, 1966.

DEEP, A.; JAIN, S.; SHARMA, P. C.; PHOGAT, P.; MALHOTRA, M. Synthesis of 2-(aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and anti-inflammatory activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 1652-1659, 2012.

DIJK, J. VAN; SARGISON, N. D.; KENYON, F.; SKUCE, P. J. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 377-392, 2010.

DRONAMRAJU, S. S.; JAQUES, B. C.; SCHMID, M.; SAMUEL, J. R.; CHARNLEY, R. M. Fascioliasis: a rare cause of liver abscess. **Postgraduate Medical Journal**, v. 90, n. 1061, p. 179-180, 2014.

ESCALONA, C.; LEÓN, J. A. DE; ÁLVAREZ, M.; CAÑETE, R. Acute fasciolosis: A cuban case report | Fasciolosis aguda: Presentación de un caso de Cuba. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 5, p. 543-546, 2012.

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J. C. Fasciolicides: Efficacy , Actions , Resistance and its. **The Veterinary Journal**, v. 158, p. 81-112, 1999.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4th ed. São Paulo: Ícone, 2004.

GIL, L. C.; DÍAZ, A.; RUEDA, C.; et al. Fascioliasis hepática humana: resistencia al tratamiento con triclabendazol. **Revista Médica de Chile**, v. 142, n. 10, p. 1330-1333, 2014.

GUIMARÃES, M. P. *Fasciola hepatica*. In: D. P. Neves; A. L. de Melo; P. M. Linardi; R. W. A. Vitor (Eds.); **Parasitologia Humana**. 12th ed., p.241-244, 2012.

São Paulo: Atheneu.

GÜZEL, Ö.; SALMAN, A. Synthesis and biological evaluation of new 5-methyl-N-(3-oxo-1-thia-4-azaspiro[4.5]-dec-4-yl)-3-phenyl-1H-indole-2-carboxamide derivatives. **Arkivoc**, v. 2006, n. 12, p. 849-857, 2006.

HANNA, R. E. B.; MCMAHON, C.; ELLISON, S.; et al. *Fasciola hepatica*: A comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxylinil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1-2, p. 34-43, 2015. Elsevier B.V.

HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; VASYLENKO, O.; et al. Synthesis and biological activity evaluation of 5-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 66, p. 228-37, 2013. Elsevier Masson SAS.

JAIN, A. K.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; KASHAW, S. K.; AGRAWAL, R. K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3378-3395, 2012. Elsevier Ltd.

JAIN, V. S.; VORA, D. K.; RAMAA, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1599-1620, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.029>>. .

JÚNIOR, J. C. C.; GOUVÊA, D. P.; RIBEIRO, C. DA S.; et al. Efficient Synthesis and Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. **Journal Biochem Molecular Toxicology**, v. 26, n. 9, p. 445-450, 2013.

KAMINSKY, D.; HARTOG, G. J. M. DEN; WOJTYRA, M.; et al. Antifibrotic and anticancer action of 5-ene amino/iminothiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 112, p. 180-195, 2016.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Basica E Clinica**. 12^a ed. 2014.

KÜÇÜKGÜZEL, I.; SATILMIŞ, G.; GURUKUMAR, K. R.; et al. 2-Heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as a new class of non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 931-941, 2013.

KUNZLER, A.; NEUENFELDT, P. D.; NEVES, A. M. DAS; et al. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 64, p. 74-80, 2013.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology**, v. 18, p. 885-936, 1988.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M. DE; GÓES, A. J. S.; et al. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. , v. 31, n. 2, p. 369-376, 2008.

LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, p. 221-232, 1990.

LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 203-213, 1991.

LWIN, T.; PROBERT, A. J. Effect of certain fasciolicides on malate dehydrogenase activity of *Fasciola hepatica*: a possible biochemical mode of action of hexachlorophene and oxyclozanide. **Pesticide Science**, , n. 6, p. 121-128, 1975.

MANVAR, D.; KÜÇÜKGÜZEL, I.; ERENŞOY, G.; et al. Discovery of conjugated thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 3, p. 743-747, 2016.

MARQUES, G. H.; KUNZLER, A.; BAREÑO, V. D. O.; et al. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives. **Medicinal chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))**, v. 10, n. 4, p. 355-360, 2014.

MCCARTHY, J.; LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J. Agentes Anti-helmínticos. In: L. L. Brunton; B. A. Chebner; B. C. Knollmann (Eds.); **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12th ed., p.1443-1461, 2012. Porto Alegre: AMGH.

MONTE, C. DE; CARRADORI, S.; BIZZARRI, B.; et al. Anti-Candida activity and cytotoxicity of a large library of new N-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 107, p. 82-96, 2016.

MORAES, R. G.; COSTA, I. DA C.; GOULART, E. G. **Parasitologia e Micologia Humana**. 5th ed. Rio de Janeiro, 2008.

MÜLLER, G. Fasciolose. In: F. Riet-Correa; A. L. Schild; R. A. A. Lemos; J. R. J. Borges (Eds.); **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3rd ed., p.639-650, 2007. Santa Maria: Pallotti.

MÜLLER, G.; BERNE, M. E. A.; RAFFI, L. L.; et al. Influência da temperatura na longevidade infectiva de metacercárias de *Fasciola hepática*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 2, p. 164-165, 1999.

MULLER, G.; LARA, S. I. M.; SILVEIRA-JR., P.; ANTUNES, P. L. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 172-176, 1998.

NOYA, B. A. DE; SOSA, L. S.; COLMENARES, C.; et al. Localización pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de gastroenterología**, v. 60, n. 2, p. 134-137, 2006.

OAKLEY, G. A.; OWEN, B.; KNAPP, N. H. Production effects of subclinical liver flukes infection in growing dairu heifers. **Veterinary Record**, v. 104, p. 503-507, 1979.

OLAECHEA, F.; LOVERA, V.; LARROZA, M.; RAFFO, F.; CABRERA, R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 364-366, 2011. Elsevier B.V.

OLIVEIRA FILHO, G. B. DE; OLIVEIRA CARDOSO, M. V. DE; ESPÍNDOLA, J. W. P.; et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 23, p. 7478-7486, 2015. Elsevier Ltd.

ORTIZ, P.; SCARCELLA, S.; CERNA, C.; et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 118-121, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001>>. .

OTTANÀ, R.; MACCARI, R.; GIGLIO, M.; et al. Identification of 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives endowed with dual activity as aldose reductase inhibitors and antioxidant agents for the treatment of diabetic complications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2797-2806, 2011.

PANITZ, E.; KNAPP, S. E. In vitro effects of certain anthelmintic drugs on histochemically demonstrable cholinesterases and succinate oxidase of *Fasciola hepatica*. **American Journal of Veterinary Research**, , n. 31, p. 763-770, 1970.

QURESHI, A. W.; TANVEER, A.; MAS-COMA, S. Epidemiological analysis of human fascioliasis in northeastern Punjab, Pakistan. **Acta Tropica**, v. 156, p. 157-164, 2016. Elsevier B.V.

RAMACHANDRAN, J.; AJJAMPUR, S. S. R.; CHANDRAMOHAN, A.; VARGHESE, G. M. Cases of human fascioliasis in India: tip of the iceberg. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 58, n. January 2011, p. 150-152, 2012.

RANE, R. A.; SAHU, N. U.; SHAH, C. P. Synthesis and antibiofilm activity of marine natural product-based 4-thiazolidinones derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7131-7134, 2012.

RAVICHANDRAN, V.; PRASHANTHA KUMAR, B. R.; SANKAR, S.; AGRAWAL, R. K. Predicting anti-HIV activity of 1,3,4-thiazolidinone derivatives: 3D-QSAR approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1180-1187, 2009.

RAWAL, R. K.; KATTI, S. B.; KAUSHIK-BASU, N.; ARORA, P.; PAN, Z. Non-

nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B RNA-dependant RNA polymerase: 2-Aryl-3-heteroaryl-1, 3-thiazolidin-4-one derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6110-6114, 2008.

ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MEANA, A.; VALCÁRCEL, F.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Update on trematode infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 15-38, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.029>>. .

SANABRIA, R.; CEBALLOS, L.; MORENO, L.; et al. Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 105-110, 2013.

SECCI, D.; CARRADORI, S.; BIZZARRI, B.; et al. Novel 1,3-thiazolidin-4-one derivatives as promising anti-Candida agents endowed with anti-oxidant and chelating properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 144-156, 2016.

SILVA, I. C.; MULLER, G.; MATTOS, M. J. T.; et al. Fasciolose I - Incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. , v. 33, n. 323, p. 34-42, 1980. Porto Alegre.

SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. In: H. de S. Spinosa; S. L. Górnika; M. M. Bernardi (Eds.); **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5th ed., p.824, 2014. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

STAMMERS, B. M. Disruption of spermatogenesis in *Fasciola hepatica* by some anthelmintics. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 47, p. 145-150, 1975.

STAMMERS, B. M. The effects of nitroxynil on the survival, growth and morphology of *Fasciola hepatica* in sheep. **Research in Veterinary Science**, , n. 20, p. 174-179, 1976.

TESSELE, B.; BRUM, J. S.; BARROS, C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 873-889, 2013.

TRIPATHI, A. C.; GUPTA, S. J.; FATIMA, G. N.; et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. Família Fasciolidae. **Parasitologia Veterinária**. 2nd ed., p.89-98, 1998. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

VILLELA, M. M.; FERRAZ, M. L. **Dicionário de Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo, 2007.

VINTONYAK, V. V.; WARBURG, K.; OVER, B.; et al. Identification and further development of thiazolidinones spiro-fused to indolin-2-ones as potent and

selective inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B. **Tetrahedron**, v. 67, n. 35, p. 6713-6729, 2011.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 181-213, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1

07/10/2016

Gmail - Submission Confirmation for Veterinary Parasitology



Fabiane Zehetmeyr <fkzfernandes@gmail.com>

Submission Confirmation for Veterinary Parasitology

VETPAR <ees.vetpar.0.3c7ddc.9c15a56b@eesmail.elsevier.com>

7 de outubro de 2016 10:45

Para: fkzfernandes@gmail.com, cristiandf2003@yahoo.com.br

Title: Ovicidal activity in vitro of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and 2-aryl-3-(3-morpholino-propyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758).
Research paper

Dear Miss. Zehetmeyr,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Parasitology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetpar/>

Your username is: fkzfernandes@gmail.com

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.