

ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE 3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona CONTRA OVOS DE *Fasciola hepatica*.

LUIZA MARQUES ARAUJO¹; NATÁLIA BERNE PINTO²; MARIA ELIZABETH
AIRES BERNE³; CLAUDIO MARTIN PEREIRA PEREIRA⁴; PATRÍCIA SILVA
NASCENTE⁵; ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – luizaaraujo202@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – pattsn@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – allisonassun10@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, em que parasitoses apresentam importância veterinária devido ao impacto econômico que acarretam. A fasciolose é vista como uma das principais infecções que acometem bovinos e ovinos, sendo segundo a OMS, uma doença tropical negligenciada, emergente e problema de saúde pública em alguns países, mesmo humanos sendo hospedeiros acidentais (OLIVEIRA & RESENDE, 2017). Sua grande importância decorre de a mesma afetar a reprodução, crescimento, produção de leite, além da qualidade da carne de ruminantes (MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2010).

A *Fasciola hepática*, pertencente a classe trematoda, é o parasita causador da fasciolose (SILVA, 2008). Os animais são infectados ao consumir água e vegetação de fonte de água contaminada com formas infectantes a qual afeta o fígado, em decorrência de se alojarem nos ductos biliares (LEVY, 2015). Estima-se que a perda econômica devido a esta infecção gire em torno de 3 bilhões de dólares ao ano no mundo (CWIKLINSKI et al., 2016).

A resistência aos atuais anti-helmínticos é um problema crescente e, somado aos poucos fármacos que estão disponíveis no mercado, ressalta a importância da descoberta de novos compostos (ALVES & MARTINS, 2013). Tendo isto em mente, as chalconas são moléculas que podem ser obtidas sinteticamente em laboratório como também de produtos naturais (GO, WU, & LIU, 2005; RITTER et al., 2015), são cetonas com dois anéis aromáticos ligados por um sistema carbonil de três carbonos α , β -insaturado (SINGH, ANAND & KUMAR, 2014; VERMA, SRIVASTAVA E PANDEY, 2018). Há relatos de diversas atividades biológicas descritas na literatura, incluindo antiparasitária (DOMÍNGUEZ et al., 2001). O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade ovicida, em diferentes concentrações da chalcona 3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona por meio de teste de eclosão de ovos.

2. METODOLOGIA

Procedimento de síntese:

A chalcona foi sintetizada no laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da UFPel, por meio da reação de Claisen-Schmidt, que envolve a condensação de uma cetona aromática com um aldeído aromático na presença de um catalisador. A identificação química dos compostos foi realizada por meio de ponto de fusão, espectroscopia de infra-vermelho, ressonância magnética nuclear (¹H e ¹³C) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Obtenção de ovos de *Fasciola hepática*:

Coletou-se *F. hepática* por meio de dissecação dos ductos biliares de fígados que foram fornecidos por frigorífico de Pelotas - RS. Após a retirada dos parasitos, eles foram acondicionados em solução fisiológica por 24 horas. Decorrido o tempo, os ovos foram coletados com tamise de quatro malhas, onde eles ficaram retidos na última, sendo em seguida transferidos para um béquer e armazenados sob refrigeração.

Ensaio de eclosão de ovos:

O ensaio foi realizado em triplicata em placas de fundo chato de 6 poços (KASVI, modelo K12-006), baseada na metodologia descrita por Robles-Pérez et al. (2014) e Arafa et al. (2015). Para o controle positivo adicionou-se 1000 µL de ovos, 4.970 µL de água e 30 µL de tiabendazol (0,025mg/ mL). Já o controle positivo não se adicionou o tiabendazol, sendo o volume então ajustado com água. O composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo realizadas três diluições baseando-se no perfil de solubilidade do composto, para atingir as concentrações finais (na placa) de 180 µM, 90 µM e 45 µM.

As placas foram envolvidas em papel alumínio e postas em estufa (28°C e 80% de umidade) por 15 dias. Passado este tempo, as placas foram expostas a luz por cerca de 30 minutos e por fim feita a contagem dos ovos (não embrionados, embrionados e eclodidos) com auxílio de microscópio invertido.

Foram utilizados 5.947 ovos de *F. hepática*, distribuídos entre os controles positivo, negativo e grupo teste. Os percentuais de eclosão e atividade ovicida foram calculados segundo o descrito por Zehetmeyr et al. (2018).

Viabilidade celular (MTT Assay):

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com o documento ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009), em fibroblasto de camundongo – linhagem celular imortalizada 3T3, no Laboratório de Cultivo Celular e de Biologia Molecular da UFPEl.

Análise estatística:

Os resultados foram tabulados em software para análise estatística e submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste Tukey para diferenciar os grupos, considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ovos de *Fasciola hepática* apresentaram resistência ao fármaco padrão (tiabendazol) na concentração final de 0,125 µg/mL, em que se observou valor médio de 48,7% (DP ± 4.9) para o percentual de inibição de eclosão. A chalcona usada no estudo foi avaliada quanto ao percentual de eclosão e atividade ovicida (**gráfico 01**). O composto sintético apresentou atividade em todas as concentrações testadas, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (água), demonstrando, dessa forma, atividade contra os ovos de *Fasciola hepática*.

Em relação ao percentual de eclosão de ovos, analisando o composto demonstrou atividade equivalente a apresentada pelo controle positivo (tiabendazol) na concentração de 45 µM, para as demais concentrações observou-se atividade superior, se mostrando assim mais eficaz em inibir a eclosão dos ovos em comparação ao medicamento padrão em sua dose terapêutica. Para a atividade ovicida, o composto na concentração de 180 e 90

μM também apresentou maior atividade que o controle positivo, seguindo com valor equivalente ao controle positivo, para a concentração de $45 \mu\text{M}$.

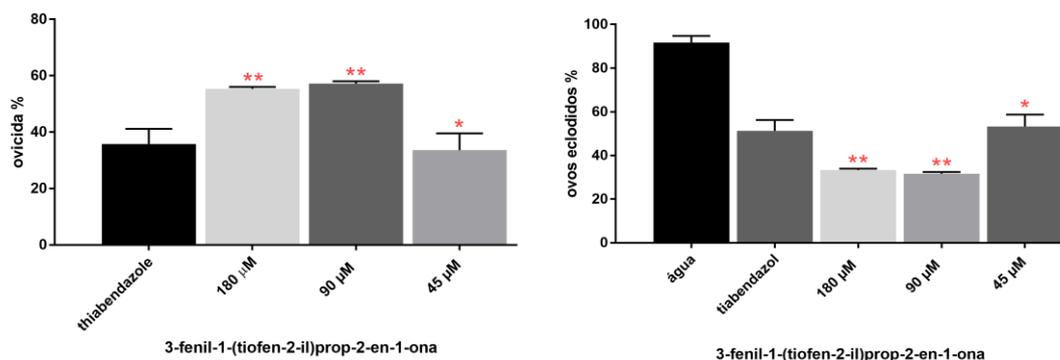


Gráfico 01: Percentual ovicida e de eclosão de ovos de chalcona sintética na concentração de $180 \mu\text{M}$, $90 \mu\text{M}$ and $45 \mu\text{M}$. A presença de um asterisco representa atividade equivalente estatisticamente significativa comparada com o controle positivo, enquanto que a presença de dois asteriscos representa atividade superior a apresentada pelo controle positivo ($p < 0.05$).

Quando avaliamos a metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}), o referido composto apresentou valor de $96.95 \mu\text{M}$, com resultados promissores uma vez que para as três concentrações testadas o composto não apresentou citotoxicidade. Na literatura já foi avaliada e comprovada a atividade antifúngica do referido composto, contra *Candida albicans* resistente ao fluconazol (Ritter et al., 2015). Ferraro et al. (2016), avaliaram a atividade inibitória de chalconas contra catepsinas em metacercárias de Fasciolas, relatando que as chalconas são bons inibidores da catepsina encontrada nos estágios juvenil (FhCL3) e maduro (FhCL1). Em *in silico* as chalconas mostraram-se ainda mais promissoras, apresentando alta biodisponibilidade oral e absorção intestinal (MIRANDA-SAPLA et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio do teste por meio de eclosão e ensaio de viabilidade celular indicam atividade promissora para o presente composto, outros estudos devem ser realizados para avaliar a real aplicação anti-helmíntica do composto, de forma que o mesmo venha a ser uma opção no mercado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVEZ, D, P. MARTINS, I, V, F. Atualizações no controle parasitário da fasciolíase em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.16, p.323-351, 2013.

ARAF, W, M. SHOKEIR, K, M. KHATEIB, A, M. Veterinary Parasitology Comparing an in vivo egg reduction test and in vitro egg hatching assay for different anthelmintics against Fasciola species, in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.214, n.1–2, p.152–158, 2015.

CWIKLINSKI, K. O'NEILL, S, M. DONNELLY, S. DALTON, J. P. A prospective view of animal and human Fasciolosis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 9, p.558-568, 2016.

DOMÍNGUEZ, J, N. CHARRIS, J, E. LOBO, G. *et al.* Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, n. 6, p.555-560, 2001.

FERRARO, F. MERLINO, A. DELL'OCA, N. *et al.* Identification of Chalcones as *Fasciola hepatica* Cathepsin L Inhibitors Using a Comprehensive Experimental and Computational Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.7, p.1-20, 2016.

GO, M, L. WU, X. LIU, X, L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v.12, n.4, p.483-499, 2005.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009. (n.d.). *ISO.pdf*.

LEVY, S; MATEUS, T.L; VIEIRA-PINTO, M. **Fasciolose**. Agronegocios.eu, Portugal. Acessado em 4 setembro. 2019. Online. Disponível em: <http://www.agronegocios.eu/noticias/fasciolose/>

MARTINES-VALLADARES, M. DEL ROSARIO FAMULARO, M. FERNANDEZ-PATO, N. *et al.* Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. **Parasitology Research**, v.107, n.5, p.1205-1211, 2010.

MIRANDA-SAPLA, M, M. TOMIOTTO-PELLISSIER, F. PAULO, J. *et al.* trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, v.853, n.8, p.275-288, 2019.

OLIVEIRA, D.M; RESENDE, P.O. *Fasciola hepatica*: ecologia e trajetória histórico-geográfica pelo Brasil. **Estcien**. Macapá, v.7, n.2, p.09-19, 2017.

PÉREZ, D.R.; PÉREZ, J.M.M.; VÁZQUEZ, F.A.R. *et al.*, Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. **Veterinary Parasitology**, v.203, p.217-221, 2014.

RITTER, M. MARTINS, R, M. ROSA, S, A. MALAVOLTA, J, L. LUND, R, G. FLORES, A, F, C. PEREIRA, C, M, P. Green Synthesis of Chalcones and Microbiological Evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, n.6, p.1201-1210, 2015.

SILVA, E,R,V. FASCILOSE HEPÁTICA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.6, n. 11, 2008.

SINGH, P. ANAND, A. KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.85, n.8, p.758-777, 2014.

VERMA, S. SRIVASTAVA, A, K. PANDEY, O, P. A Review on Chalcones Synthesis and their Biological Activity. **PharmaTutor**, v.6, n.2, p.22-39, 2018.

ZEHETMEYR, F, K. SILVA, M, A, M, P. DA, PEREIRA, K. M., *et al.* Ovicidal in vitro activity of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). **Experimental Parasitology**, v. 192, n.9, p. 60-64, 2018.