

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALINE PEREIRA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS E
ESQUISTOSSOMICIDA DA BENZOFENONA 7-EPICLUSIANONA**

Alfenas/MG

2017

ALINE PEREIRA CASTRO

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS E
ESQUISTOSSOMICIDA DA BENZOFENONA 7-EPICLUSIANONA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Castro, Aline Pereira

Avaliação dos aspectos farmacológicos, toxicológicos e esquistossomicida da benzofenona 7-epiclusianona. / Aline Pereira Castro. - 2017.

139 f. -

Orientador: Marcos José Marques.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

Bibliografia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Garcinia*. 3. Benzofenonas. 4. Farmacocinética. 5. Toxicidade. I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD: 615.1

ALINE PEREIRA CASTRO

“Avaliação dos aspectos farmacológicos, toxicológicos e esquistossomicida da benzofenona 7-epiclusianona”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 15 / 08 /2017

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura: 

Profa. Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano
Instituição: USP

Assinatura: 

Profa. Dra. Raquel Lopes Martins Sousa
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo T. Pacheco
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Acredito que um trabalho se torna grandioso devido ao empenho, participação e compromisso de uma equipe multidisciplinar. Este estudo só se tornou possível através da colaboração de pessoas aos quais gostaria de expressar meu carinho e gratidão.

Agradeço a Deus pela sublime presença em minha vida, pelos obstáculos e pelas vitórias. Os obstáculos que me ajudaram a crescer, e as vitórias que me ensinaram que ter fé é a principal arma para atingir nossos objetivos.

Ao meu querido orientador Professor Dr. Marcos José Marques pela sua preciosa orientação, pela compreensão nos dias em que mais precisei, e principalmente pela amizade. Obrigada pela a confiança depositada, pelos conselhos e oportunidade. Sempre me lembrarei dos vários ensinamentos científicos e da pessoa maravilhosa que você é. Obrigada!!!!

Ao Professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos, meu coorientador, pessoa que tive a honra de conhecer e a oportunidade de trabalhar. Meu muito obrigado pela amizade, pelo carinho, pela dedicação e pelos ensinamentos.

A professora Dra. Luciana Azevedo e sua aluna Laila Vieira, a professora Dra Gislaine Ribeiro Pereira e seu aluno André Luís Morais Ruela, a professora Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques e sua aluna Taila Kawano, a professora Maria Rita Rodrigues e seu aluno André Luiz Machado Viana, pela excelente colaboração, sem vocês esse trabalho não teria sido possível, meu muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pela amizade, ajudas constantes, momentos de alegria e descontração, durante todos estes anos de permanência. Em especial ao Fábio, Juliana, Yan, Frederico, Ana Flávia, Patrícia, Joana, Lívia, Andreísa, Matheus, Isabela. Muito obrigada pela a oportunidade de conhecê-los, sentirei muito a falta de vocês;

As auxiliares Fran e D. Maria Helena, pelo carinho, ela companhia e pelo cafezinho que me mantinha aquecida nos dias frios e ao mesmo tempo alerta.

À Ana Carolina de Mattos e a Flávia Fernanda Búbula Couto grandes pessoas que conheci no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, muito obrigada pelas ajudas, pelo incentivo, pelas correções, pelas sugestões, pela amizade e pelo carinho.

À Neusa Araújo pela ajuda nos testes *in vivo*.

Ao meu marido Herick, a minha filha Luna e ao meu filho Theo pela compreensão durante minhas ausências, pelo companheirismo, dedicação, apoio e principalmente pela demonstração de amor.

Aos meus pais José Maria e Arlette que se fizeram presentes em cada momento desta importante jornada da minha vida, merecendo assim minha eterna gratidão pelo amor e carinho;

A vocês que estiveram ao meu lado nas horas em que chorei e nas horas em que sorri, nas horas em que me lamentei e nas horas em que me mostrei alegre. Agradeço pelo sorriso diário, pela convivência agradável. Agradeço mais uma vez a todos que de alguma forma contribuíram para este momento de grande alegria em minha vida.

À CAPES e UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos por tudo!

RESUMO

A esquistossomose é uma doença causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, que afeta cerca de 230 milhões de pessoas no mundo. Recentemente, cepas de *Schistosoma mansoni* tem desenvolvido tolerância e resistência contra o praziquantel (PZQ) que é o único fármaco disponível no mercado, usado no tratamento dessa doença. Estes problemas relacionados à resistência justificam estudos que busquem alternativas para a prevenção, tratamento e cura da doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade química, a farmacocinética, os efeitos tóxicos e esquistossomicidas da 7-epiclusianona (7-epi), uma substância isolada da *Garcinia brasiliensis*. Ensaio de estabilidade química usando HPLC-UV-VIS, farmacocinéticos utilizando UPLC-MS/MS, bioquímicos avaliando marcadores de função hepática (aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase, albumina, proteínas totais e glicose) e renal (creatinina), toxicidade *in vivo* pelo teste cometa, micronúcleo de medula e colon e apoptose foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos dessas substâncias em modelos murinos. A 7-epi se demonstrou estável nos testes de degradação forçada, contudo na presença de peróxido de hidrogênio 0,3% (v/v) ocorreu degradação dando origem a forma oxidada deste composto. Por sua vez, os testes farmacocinéticos analisaram a 7-epi em plasma de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, a qual apresentou um aumento da área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (20846 vs 32438 ng.h/mL), uma diminuição da depuração total aparente (0,006 vs 0,004 L/h/kg), aumento da meia-vida (1,73 vs 6,11h) e a redução concentração plasmática máxima (5427,5 vs 3321,0 ng/mL) em comparação com o grupo não infectado, mas o tempo para atingir concentração plasmática máxima não apresentou diferença significativa. Nos testes toxicológicos usando ensaio cometa, teste de micronúcleo de medula e colon; além dos testes de apoptose, a 7-epi não provocou lesão no DNA e ainda foi capaz de proteger a célula contra a lesão provocada pela doxirrubicina e N,N'-dimetilhidrazina. Enquanto que na avaliação bioquímica apesar da 7-epi não provocar efeitos tóxicos para o hospedeiro, ela não foi capaz de corrigir os danos causados pelos ovos de *S. mansoni*. Nos testes esquistossomicida *in vivo* não foram observados efeitos significativos no verme adulto, quando os camundongos infectados foram tratados com 7-epi, porém houve uma redução da área do granuloma (46,0%) e da contagem

de eosinófilos no tecido hepático (45,0%). A 7-epi não demonstrou toxicidade nos parâmetros avaliados e ainda foi capaz de proteger a células contra os danos causados pelos agentes lesivos. Os resultados obtidos mostraram uma significativa atividade esquistossomicida *in vivo* na dose de 300 mg/Kg. Além disso, houve redução no tamanho do granuloma. Embora, estes resultados sejam preliminares apontam para a importância de avaliar *in vivo* a atividade dessa substância usando diferentes regimes de tratamento e formulações de 7-epi lipossomada para melhorar sua eficácia.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. *Garcinia brasiliensis*. 7-epiclusianona. Farmacocinética. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease caused by helminths of the genus *Schistosoma*, which threatens about 230 million people worldwide. Recently, strains of *Schistosoma mansoni* have developed tolerance and resistance against praziquantel (PZQ), which is the only drug available on the market, used to treat this disease. These related resistance problems justify studies that seek alternatives for the prevention, treatment and cure of the disease. The objective of this study was to evaluate the chemical stability, pharmacokinetics, toxic and schistosomicidal effects of 7-epiclusianone (7-epi), a substance isolated from *Garcinia brasiliensis*. Assays for chemical stability using HPLC-UV-VIS, pharmacokinetics using UPLC-MS/MS, biochemists evaluating hepatic function markers (aspartate-aminotransferase, alanine-aminotransferase, albumin, total proteins and glucose) and renal (creatinine) function, *in vivo* toxicity By the comet test, micronucleus of marrow and colon and apoptosis were carried out with the objective of evaluating the effects of these substances in murine models. 7-epi was shown to be stable in the forced degradation tests, however in the presence of 0,3% (v / v) hydrogen peroxide degradation occurred to give the oxidized form of this compound. In turn, pharmacokinetic tests analyzed 7-epi in plasma from mice infected by *Schistosoma mansoni*, showed an increase in area under the plasma concentration versus time curve (20846 vs 32438 ng.h / mL), a decrease in apparent total clearance (0.006 vs 0.004 L / h / kg), increased half-life (1.73 vs 6.11 h) and maximum plasma concentration was reduced (5427.5 vs. 3321.0 ng / mL) compared to the uninfected group, but the time to reach maximum plasma concentration did not present significant difference. In toxicological tests using comet assay, micronucleus test of marrow and colon, besides to the apoptosis tests, 7-epi did not cause DNA damage and was still able to protect the cell from damage caused by doxorubicin and N, N'-dimethylhydrazine. While in the biochemical evaluation although 7-epi did not cause toxic effects to the host, it was not able to correct the damage caused by *S. mansoni* eggs. In the *in vivo* schistosomicidal tests, no significant effects were observed in the adult worm, when infected mice were treated with 7-epi, but there was a reduction in the area of granuloma (46.0%) and eosinophil count in hepatic tissue (45.0%). 7-epi showed no toxicity in the evaluated parameters and was still able to protect the cells against damage caused by the damaging agents. The results obtained showed a significant

schistosomicidal activity *in vivo* at the dose of 300 mg / kg. In addition, there was a reduction in the size of granuloma. Therefore, these results are preliminary and point out the importance of assessing *in vivo* the activity of this substance using different treatment regimens and 7-epi liposome formulations to improve its efficacy.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. *Garcinia brasiliensis*. 7-epiclusianone. Pharmacokinetics. Cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|---------------------|---|--|
| ADME | – | Absorção, distribuição, metabolismo e excreção |
| ALT | – | Alanina-aminotransferase |
| ANOVA | – | Análise de Variância |
| AST | – | Aspartato-aminotransferase |
| ATR | – | Refletância total atenuada |
| AUC- ∞ | – | Área sob a curva |
| CC | – | Colunas de sílica gel |
| CEUA | – | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| Cl | – | Clearance |
| Cmax | – | Concentração plasmática máxima |
| CPqRR | – | Centro de Pesquisas René Rachou |
| CQ | – | Controle de qualidade |
| CQA | – | Controle de qualidade alto |
| CQB | – | Controle de qualidade baixo |
| CQM | – | Controle de qualidade médio |
| ^{13}C RMN | – | Ressonância magnética nuclear de carbono |
| CV | – | Coefficiente de variação |
| CYP | – | Isoenzima citocromo P450 |
| DMH | – | N,N'-dimetilhidrazina |
| DP | – | Desvio padrão |
| DPR | – | Desvio padrão relativo |
| DXR | – | Doxorubicina |
| 7-epi | – | 7- Epiclusianona |
| ESI | – | Eletrospray |
| FDA | – | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FIOCRUZ | – | Fundação Oswaldo Cruz |
| FTIR | – | Infravermelho por Transformada de Fourier |
| HMBC | – | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HPLC | – | Cromatografia líquida de alta performance |
| ^1H RMN | – | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| ICH | – | Conferência Internacional sobre Harmonização |
| IV | – | Infravermelho |

| | |
|------------------|--|
| LE | – Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem susceptível ao PZQ, isolada do paciente Luis Evangelista, mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ |
| LQ | – Limite de quantificação |
| MN | – Micronúcleo |
| NCE | – Eritrócitos normocromáticos |
| OMS | – Organização Mundial de Saúde |
| OXA | – Oxaminiquina |
| PCE | – Eritrócitos policromáticos |
| PI | – Padrão interno |
| PZQ | – Praziquantel |
| RMN | – Ressonância magnética nuclear |
| SEA | – Antígenos solúveis do ovo |
| SFB | – Soro fetal bovino |
| TLC | – Cromatografia em camada delgada |
| t _{1/2} | – Tempo de meia vida |
| UPLC-MS/MS | – Cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao espectrofotômetro de massa |
| UV | – Ultravioleta |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ciclo evolutivo do <i>Shistosoma mansoni</i> | 25 |
| Figura 2 - Frutos de <i>Garcinia brasiliensis</i> e estrutura química da benzofenona 7-epiclusianona..... | 32 |
| Figura 3 - Etapas da carcinogênese | 38 |
| Figura 4 - Classificação dos cometas Nucleóides que não apresentam cauda (classe 0), nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide (classe 1), nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide (classe 2), nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide | 41 |
| Figura 5 - Processo de formação do micronúcleo | 42 |
| Figura 6 - Fluxograma das atividades realizadas com a 7-epiclusianona..... | 46 |
| Figura 7 - Esquema da extração e purificação da 7-epiclusianona a partir do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i> | 48 |
| Figura 8 - Representação esquemática do teste do cometa | 71 |
| Figura 9 - Cromatogramas obtido por HPLC-UV-VIS mostrando o tempo de retenção da 7-epiclusianona | 79 |
| Figura 10 - Cromatogramas obtido por HPLC-UV-VIS mostrando o tempo de retenção da 7-epiclusianona e do produto de degradação da 7-epiclusianona após estresse oxidativo | 80 |
| Figura 11 - Cinética de degradação da 7-epi e formação do produto de degradação oxidativo utilizando o método HPLC-UV..... | 81 |
| Figura 12 - Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-VIS, apresentando o pico da 7-epiclusianona e do produto de degradação nos extratos após o estresse oxidativo | 84 |
| Figura 13 - Padrão de fragmentação da A) 7-epiclusianona (501,3 m / z) e B) seu produto degradação oxidativa (517,3 m / z) analisado por LC-MS / MS usando ESI -..... | 86 |
| Figura 14 - Curvas de absorção no UV mostrando (A) 7-epiclusianona e (B) o produto de degradação oxidativo da 7-epiclusianona. | 87 |
| Figura 15 - Espectros no infravermelho mostrando a 7-epiclusianona e seu produto de degradação oxidativo | 88 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H a 300 (A) 7-epiclusianona (CD_3OD), (B) 7-epiclusianona (CDCl_3), (C) 7-epiclusianona oxidada (CD_3OD) e (D) 7-epiclusianona oxidada (CDCl_3) | 89 |
| Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C a 300 (A) 7-epiclusianona (CD_3OD), (B) 7-epiclusianona (CDCl_3), (C) 7-epiclusianona oxidada (CD_3OD) e (D) 7-epiclusianona oxidada (CDCl_3) | 90 |
| Figura 18 - Espectro gHMBC a 300 MHz para 7-epiclusianona oxidada (CDCl_3) | 92 |
| Figura 19 - Estrutura química do Oblongifolin C..... | 93 |
| Figura 20 - Reação de radicais livres induz o estabelecimento de um equilíbrio cetoenólico de 7-epiclusianona, resultando na formação de seu produto de degradação oxidativa..... | 94 |
| Figura 21 - Análise cromatográfica da por UPLC-MS/MS: (A) diazepam (PI) e (B) 7- epiclusianona..... | 95 |
| Figura 22 - Curva analítica da 7-epiclusianona em plasma de camundongo .. | 96 |
| Figura 23 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para a 7-epiclusianona após da administração de dose oral única de 15 mg/kg a camundongos Swiss | 99 |
| Figura 24 - Avaliação sérica da Aspartato aminotransferase (AST), da Alanina aminotransferase (ALT) nos animais do grupo não infectado e infectados tratados com 7-epiclusianona..... | 102 |
| Figura 25 - Avaliação sérica da albumina e proteínas totais nos grupos não infectados e infectados tratados com 7-epiclusianona | 103 |
| Figura 26 - Avaliação sérica da creatinina nos animais dos grupos não infectados e infectados tratados com 7-epiclusianona | 104 |
| Figura 27 - Avaliação sérica da glicose nos grupos não infectados e infectados tratados com 7-epiclusianona | 105 |
| Figura 28 - Teste do Cometa analisado em microscópio Nikon RI2, com aumento de 20x. A: Grupo controle tratado com Na Cl 0,9% célula sem danos no DNA; B: células com extenso dano no DNA grupo tratado com DXR..... | 107 |
| Figura 29 - Cometa em células do fígado: Tail Length – comprimento da cauda, % DNA in Tail - % DNA na cauda, Tail Moment..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| Figura 30 - Cometa em leucócito de sangue periférico - tail length – comprimento da cauda, % DNA in Tail - % DNA na cauda, Tail Moment | 111 |
| Figura 31 - (A): Perfil de danos avaliados em eritrócitos na medula óssea 24 horas após administração de 30,0 mg/ Kg de DXR. Eritrócito micronucleados em objetiva de 100x, a seta indica presença de MN. Fonte: Silva,2014.(B): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24horas após administração de 30,0 mg/kg de DMH. Colonócitos micronucleados em objetiva de 100x, a seta indica presença de MN. Fonte: da autora. (C): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30,0 mg/kg de DMH. Célula apoptótica em objetiva de 100x a seta indica presença de célula em apoptose..... | 117 |
| Figura 32 - Densidade de número (QA) e área do granuloma esquistossomótico no fígado de camundongos infectados e tratados com 7-epiclusianona..... | 123 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona e diazepam em plasma por UPLC-MS/MS | 56 |
| Tabela 2 - Delineamento experimental dos testes bioquímicos | 66 |
| Tabela 3 - Relação de analitos, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda | 67 |
| Tabela 4 - Protocolo de utilização dos agentes químicos | 69 |
| Tabela 5 - Delineamento experimental dos testes de citotoxicidade..... | 70 |
| Tabela 6 - Delineamento experimental dos testes parasitológicos | 76 |
| Tabela 7 -Parâmetros cromatográficos (HPLC-UV-VIS) obtidos na determinação de 7-epiclusiano | 81 |
| Tabela 8 - Porcentagem de recuperação da 7-epiclusianona após submetido as condições de stress forçado | 82 |
| Tabela 9 - Precisão e recuperação do método analítico | 83 |
| Tabela 10 - Análise quantitativa da 7-epi antes e após estresse oxidativo nos extratos etanólico, hexânico e acetate de etila..... | 85 |
| Tabela 11 - Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (δC) e de hidrogênio (δH) da 7-epiclusianona e da 7-epiclusianona oxidada..... | 91 |
| Tabela 12 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS..... | 96 |
| Tabela 13 - Efeito matriz referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS..... | 97 |
| Tabela 14 - Testes de estabilidade referente ao método bioanalítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS..... | 98 |
| Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de 7-epiclusianona (15 mg/kg) em camundongos infectados e camundongos não infectados. Mediana, IC 95% e valor de p (n = 6) | 99 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 16 - Os efeitos da 7-epiclusianona nas frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de camundongos..... | 113 |
| Tabela 17 - Efeitos da 7-epiclusianona em frequências de colonócitos micronucleados | 115 |
| Tabela 18 - Efeitos da 7-epiclusianona em frequências de apoptose | 118 |
| Tabela 19 - Média dos resultados obtidos de camundongos infectados com 100 ± 10 cercárias dacepa LE de <i>S. mansoni</i> , tratados via oral com 100,0 e 300,0 mg/Kg, administrados durante cinco dias consecutivos, e sacrificados no dia seguinte após o término do tratamento | 119 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 23 |
| 2.1 | ESQUISTOSSOMOSE | 23 |
| 2.1.1 | Aspectos Epidemiológicos e Clínicos | 23 |
| 2.1.2 | Controle e Tratamento da Esquistossomose..... | 28 |
| 2.2 | PLANTAS MEDICINAIS E A ESQUISTOSSOMOSE | 30 |
| 2.3 | ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA 7-EPICLUSIANONA | 31 |
| 2.4 | ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO | 33 |
| 2.5 | ENSAIOS FARMACOCINÉTICOS | 34 |
| 2.6 | ESTUDOS DE TOXICIDADE | 35 |
| 2.6.1 | Marcadores Bioquímicos de Toxicidade | 36 |
| 2.6.2 | Genotoxicidade Versus Antigenotoxicidade e Mutagenicidade Versus Antimutagenicidade | 37 |
| 2.6.2.1 | Ensaio Cometa | 40 |
| 2.6.2.2 | Testes de Micronúcleo (MN) | 41 |
| 2.6.2.3 | Apoptose | 42 |
| 3 | OBJETIVOS | 45 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 45 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 46 |
| 4.2 | OBTENÇÕES DA 7-EPICLUSIANONA..... | 46 |
| 4.2.1 | Local de Execução | 46 |
| 4.2.2 | Coleta do Material Vegetal..... | 47 |
| 4.2.3 | Preparo do Extrato, Isolamento e Purificação da Substância... | 47 |
| 4.3 | ENSAIOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA..... | 48 |
| 4.3.1 | Aspectos Gerais | 48 |
| 4.3.2 | Reagentes | 49 |
| 4.3.3 | Análise por HPLC-UV | 49 |
| 4.3.4 | Análise dos Extratos de <i>G. Brasiliensis</i> | 49 |
| 4.3.5 | Solubilidade da 7-Epiclusianona em á Água..... | 50 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.3.6 | Estudos de Degradação Forçada..... | 50 |
| 4.3.7 | Cinética da Degradação de 7-epiclusianona em Peróxido de Oxigênio | 51 |
| 4.3.8 | Estudos de Validação | 51 |
| 4.3.8.1 | Seletividade | 51 |
| 4.3.8.2 | Linearidade..... | 52 |
| 4.3.8.3 | Limite de Quantificação (LQ)..... | 52 |
| 4.3.8.4 | Precisão | 52 |
| 4.3.8.5 | Exatidão | 53 |
| 4.3.9 | Caracterização do Produto de Degradação Oxidativo | 53 |
| 4.4 | DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DA 7-EPICLUSIANONA | 54 |
| 4.4.1 | Aspectos Gerais | 54 |
| 4.4.2 | Materiais | 54 |
| 4.4.2.1 | Reagentes | 54 |
| 4.4.2.2 | Equipamentos..... | 55 |
| 4.4.3 | Análise Instrumental | 55 |
| 4.4.3.1 | Condições Cromatográficas Para Análise de 7–Epiclusianona e Padrão Interno (Diazepam) | 55 |
| 4.4.3.2 | Preparo das Soluções Padrão..... | 56 |
| 4.4.3.3 | Padrão Interno | 57 |
| 4.4.3.4 | Extração Líquido-Líquido de 7-Epiclusianona da Matriz Biológica .. | 57 |
| 4.4.4 | Validação do Método Bioanalítico | 57 |
| 4.4.4.1 | Definição das Concentrações das Amostras de Controle de Qualidade (CQ) em Plasma | 58 |
| 4.4.4.2 | Linearidade e Curva de Calibração | 58 |
| 4.4.4.3 | Precisão e Exatidão Intra e Interdia..... | 59 |
| 4.4.4.4 | Efeito Residual | 59 |
| 4.4.4.5 | Efeito Matriz | 60 |
| 4.4.4.6 | Estabilidade..... | 60 |
| 4.4.4.6.1 | <i>Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....</i> | <i>60</i> |
| 4.4.4.6.2 | <i>Estabilidade de curta duração</i> | <i>61</i> |
| 4.4.4.6.3 | <i>Estabilidade das amostras processadas</i> | <i>61</i> |
| 4.4.5 | Ensaio com Animais | 61 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.4.5.1 | Manutenção do Ciclo do <i>S. mansoni</i> em Laboratório..... | 62 |
| 4.4.5.1.1 | <i>Infecção e exame dos caramujos</i> | 62 |
| 4.4.5.1.2 | <i>Infecção dos camundongos</i> | 62 |
| 4.4.6 | Parâmetros Farmacocinéticos e Análise Estatística..... | 64 |
| 4.5 | ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 7-EPICLUSIANONA..... | 65 |
| 4.5.1 | Ensaio de Avaliação dos Marcadores Bioquímicos de Toxicidade | 65 |
| 4.5.1.1 | Aspectos Gerais..... | 65 |
| 4.5.1.2 | Experimentação em Animais..... | 65 |
| 4.5.1.3 | Delineamento Experimental..... | 65 |
| 4.5.1.4 | Obtenção do Soro..... | 66 |
| 4.5.1.5 | Dosagem do Soro..... | 66 |
| 4.5.1.6 | Análise Estatística..... | 67 |
| 4.5.2 | Ensaio de Genotoxicidade Versus Antigenotoxicidade, Mutagenicidade Versus Antimutagenicidade | 68 |
| 4.5.2.1 | Aspectos Gerais..... | 68 |
| 4.5.2.2 | Animais e Reagentes..... | 68 |
| 4.5.2.3 | Delineamento Experimental..... | 69 |
| 4.5.2.4 | Ensaio de Cometa..... | 70 |
| 4.5.2.4.1 | <i>Soluções para o ensaio do Cometa</i> | 71 |
| 4.5.2.4.2 | <i>Procedimento Experimental</i> | 72 |
| 4.5.2.5 | Teste de Micronúcleo (MN)..... | 73 |
| 4.5.2.5.1 | <i>Micronúcleo de medula</i> | 74 |
| 4.5.2.5.2 | <i>Micronúcleo de cólon</i> | 75 |
| 4.5.2.6 | <i>Apoptose</i> | 75 |
| 4.5.2.7 | <i>Análise Estatística</i> | 75 |
| 4.6 | ESTUDOS ESQUISTOSSOMICIDA..... | 76 |
| 4.6.1 | Infecção dos Camundongos | 76 |
| 4.6.2 | Delineamento Experimental | 76 |
| 4.6.3 | Contagem de Vermes | 76 |
| 4.6.4 | Oograma | 77 |
| 4.6.5 | Análise Estatística | 77 |
| 4.6.6 | Análise Histopatológica dos Animais Infectados | 77 |
| 4.6.6.1 | Análise Histomorfométrica dos Granulomas..... | 77 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.6.6.2 | Análise do Infiltrado Inflamatório Tecidual..... | 78 |
| 4.6.6.3 | Análise Estatística | 78 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 79 |
| 5.1 | RENDIMENTO DO EXTRATO E PORCENTAGEM DE PUREZA DA SUBSTÂNCIA..... | 79 |
| 5.2 | ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DA 7-EPICLUSIANONA | 79 |
| 5.3 | DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DA 7-EPICLUSIANONA | 94 |
| 5.3.1 | Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico para Quantificação de 7-epiclusianona em Plasma de Camundongo | 95 |
| 5.3.1.1 | Linearidade..... | 95 |
| 5.3.1.2 | Precisão e Exatidão..... | 96 |
| 5.3.1.3 | Efeito Residual | 97 |
| 5.3.1.4 | Estabilidade..... | 97 |
| 5.3.2 | Farmacocinética da 7-epiclusianona em Camundongos não Infectados e Infectados com <i>S. mansoni</i>..... | 98 |
| 5.4 | ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 7-EPICLUSIANONA..... | 101 |
| 5.4.1 | Avaliação dos Marcadores Bioquímicos de Toxicidade | 101 |
| 5.4.2 | Avaliação dos Efeitos Genotóxicos, Antigenotóxicos Mutagênicos e Antimutagênicos da 7-Epiclusianona | 106 |
| 5.4.2.1 | Análise do Teste Cometa em Células de Sangue e Fígado, Análise de Eritrócitos Micronucleados de Medula, de Colonócitos Micronucleados e Presença de Células Apoptóticas no Cólon. | 106 |
| 5.4.2.1.1 | <i>Avaliação dos testes do Cometa em células do sangue e fígado ...</i> | 107 |
| 5.4.2.1.2 | <i>Avaliação dos eritrócitos de medula e de colonócitos micronucleados</i> | 112 |
| 5.4.2.1.3 | <i>Avaliação de células apoptótica de cólon.....</i> | 116 |
| 5.5 | ESTUDO ESQUISTOSSOMICIDA | 119 |
| 5.6 | ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ANIMAIS INFECTADOS..... | 121 |
| 6 | CONCLUSÕES | 124 |
| | REFERÊNCIAS | 125 |

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública em muitas partes do mundo, particularmente em muitos países em desenvolvimento, refletindo a situação econômica e social desses países. Neste contexto, as infecções por helmintos são consideradas prioridade na saúde pública em diversas partes do mundo. Entre as helmintoses, a esquistossomose continua sendo a de principal significância médica em grande parte do planeta e uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo (BUGSSA, 2015).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, os quais desempenham o papel de hospedeiros intermediários. A partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o controle da esquistossomose passou a se concentrar na redução da doença por meio da quimioterapia com oxamniquine (OXA) e com praziquantel (PZQ), envolvendo tratamento regular de todas as pessoas em grupos de risco. Contudo, o tratamento deve ser complementado com a educação sanitária, bem como o acesso à água potável e saneamento adequado (WHO, 2014).

Apesar da OXA e do PZQ serem os dois fármacos esquistossomicidas disponíveis para o tratamento da doença, o PZQ tem sido o único fármaco utilizado no momento e a utilização desse único fármaco em grande escala e em tratamentos recorrentes tem resultado no aparecimento de cepas resistentes. Neste sentido, justifica-se a busca de alternativas para o tratamento desta parasitose (RODER; THOMSON, 2015).

Desde as mais antigas civilizações o homem tem utilizado plantas para fins medicinais e alimentares. Todos os povos, em todos os continentes utilizam plantas com propriedades terapêuticas. É admirável que esse conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se (HAYTA; POLAT; SELVI, 2014). A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, em que se constata que aproximadamente 25,0% dos medicamentos prescritos em todo mundo originam-se de plantas. Dos 252 medicamentos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11,0% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos

semissintéticos obtidos de fonte natural (WHO, 2012). Ainda de acordo com a OMS, aproximadamente 80,0% da população mundial utiliza medicamentos tradicionais, básicos para a saúde, a maioria envolvendo uso de extrato de plantas ou compostos ativos isolados das mesmas (WHO, 2012). Vários produtos naturais isolados de plantas superiores, após vários estudos, tornaram-se agentes clínicos, como exemplo pode-se citar os antimaláricos quinina e quinidina isolados da *Cinchona* spp e a artemisina isolado da *Artemisia annua* (FERNÁNDEZ-ÁLVARO et al., 2016).

Neste contexto, a espécie *Garcinia brasiliensis* Mart. também conhecida como *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, tem sido estudada quanto a utilização dos frutos no tratamento do câncer (SALES et al., 2015) como leishmanicida (DE ALMEIDA et al., 2015) e antioxidante (GONTIJO et al., 2012). É encontrada em todo o território brasileiro, sendo conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari (Brasil) e como guapomo (Bolívia). É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (SARONI ARWA et al., 2015).

Compostos isolados do epicarpo do fruto desta planta já apresentaram atividade *in vitro* sobre cercaria, esquistossômulos e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (CASTRO et al., 2015). Visto o grande número de estudos que vem sendo feito com a 7-epiclusianona (7-epi) e as grandes dificuldades no tratamento da esquistossomose, como cepas resistentes e as altas taxas de infecção e reinfecção, este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade química, a farmacocinética, os efeitos tóxicos e esquistossomicidas da 7-epi, uma substância isolada da *G. brasiliensis* no contexto *in vivo* no hospedeiro definitivo usando modelos murinos não infectados e infectados com *S. mansoni*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura aborda os aspectos gerais da esquistossomose, bem como da 7-epi, seu isolamento e purificação, assim como suas atividades biológicas. Considerações como estabilidade, perfil farmacocinético e toxicidade também foram realizados.

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma das 17 doenças listadas, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como o grupo de doenças tropicais negligenciadas. É uma doença endêmica encontrada principalmente em regiões pobres, rurais e da periferia das cidades com desenvolvimento socioeconômico precário.

2.1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos

Em 2010, a OMS informou que a mortalidade por esquistossomose poderia atingir 280.000 pessoas por ano somente na África (SAVIOLI et al., 2017).

Doença endêmica de importância mundial, a esquistossomose é considerada a segunda parasitose de maior impacto em termos sócio - econômicos e de saúde pública, perdendo somente para a malária. Afeta amplas áreas geográficas, com aproximadamente 230 milhões de pessoas infectadas e cerca de 200 mil apresentam risco de óbito pela doença a cada ano (COLLEY et al., 2014; RICHTER et al., 2015). Prevalente em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres, sem acesso a água potável e saneamento adequado (KING; DICKMAN; TISCH, 2005; WHO, 2014).

A esquistossomose é causada por parasitos trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*. As principais espécies de *Schistosoma* que infectam o homem são (i) *S. mansoni*, transmitido por moluscos do gênero *Biomphalaria* e causador da esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na África, península Arábica, Caribe e América do Sul; (ii) *S. haematobium*, transmitido por moluscos do gênero *Bulinus* que causa a esquistossomose urinária na África e na península Arábica; (iii) *S. japonicum*, transmitido por moluscos do gênero *Oncomelania* que causa esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na China, Filipinas e Indonésia e (iv)

S. mekongi, transmitido por moluscos do gênero *Neotricula* e causador da esquistossomose intestinal e hepatoesplênica no Camboja (GALINIER et al., 2017).

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados, estima-se que aproximadamente 6 milhões de pessoas estejam infectadas e 25 milhões estão em risco de contrair a doença (WHO, 2012). Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de alta prevalência, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média transmissão e focos isolados. Os estados de Minas Gerais e da Bahia concentram 70,0% dos casos com base em dois inquéritos nacionais de esquistossomose realizados no Brasil (COURA; AMARAL, 2004; MELO et al., 2014).

O ciclo biológico (Figura 1) do *S. mansoni* é complexo, pois é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo do gênero *Biomphalaria*). Há, ainda, duas passagens de larvas de vida livre (miracídio e cercária) no meio aquático, que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa em condições favoráveis em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de 45 dias. No molusco do gênero *Biomphalaria*, o ciclo é assexuado, dura aproximadamente, 30 dias (COLLEY et al., 2014). A transmissão da doença ocorre com o contato do homem com águas contendo larvas do parasito, as cercárias. O ciclo de vida do parasito ocorre com a penetração das cercárias na pele do hospedeiro definitivo, onde se transformam em esquistossômulos que migram para os pulmões. Dos pulmões, os esquistossômulos migram para o sistema porta-hepático onde se transformam em vermes adultos. Após a maturação sexual o verme acasalado movimenta-se contra a corrente sanguínea e se aloja no plexo mesentérico, produzindo centenas de ovos por dia (NEVES et al., 2015). Parte dos mais de 300 ovos produzidos diariamente por cada fêmea fica retida na mucosa intestinal e nos capilares do sistema porta do hospedeiro, sendo estes os principais responsáveis pela patogenia da doença. Ocasionalmente os ovos podem se alojar em outros tecidos e causar doenças como a neuroesquistossomose (COLLEY et al., 2014). O restante dos ovos é eliminado com as fezes e em contato com a água eclodem

liberando os miracídios. Estes infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria*, nos quais, cada miracídio se transforma em esporocisto I. Cada esporocisto I, por poliembrionia, origina 150 a 200 esporocistos II. Estes migram para a glândula digestiva (hepatopâncreas) e ovoteste do caramujo, dando origem a milhares de cercárias que serão liberadas na água (COLLEY et al., 2014).

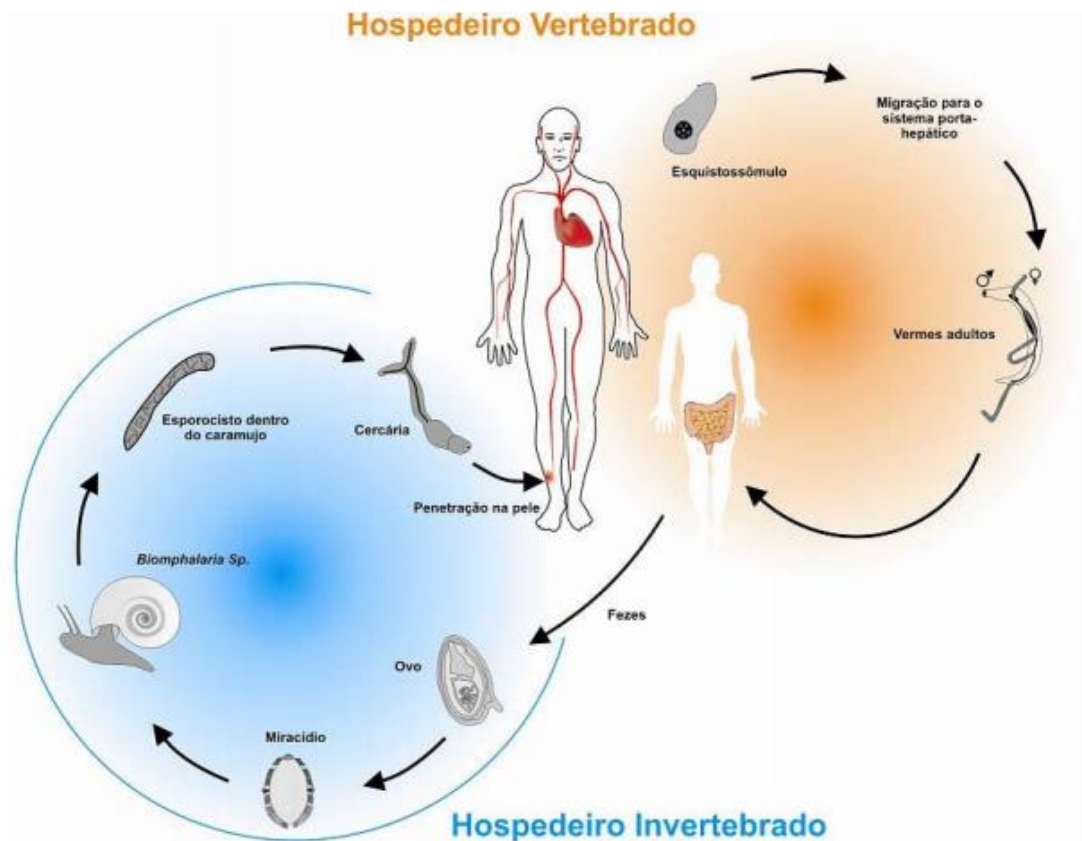


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br/content/schistosoma-mansoni-transcriptomeproject>.

A infecção pelo *S. mansoni* pode se desenvolver como uma forma aguda ou como uma doença crônica, se não for interrompida pela quimioterapia específica. A forma clínica aguda acomete, normalmente, indivíduos não residentes em áreas endêmicas, que entram em contato com águas contaminadas por larvas do parasito pela primeira vez (COLLEY et al., 2014). Entretanto, a fase aguda também pode ser observada em populações endêmicas, afetando principalmente crianças que são expostas ao parasito pela primeira vez (CALDAS et al., 2008). Todas as espécies conhecidas de *Schistosoma* podem levar ao desenvolvimento da fase aguda da doença em humanos infectados (JAURÉGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010).

A fase aguda da esquistossomose, também denominada Febre de Katayama é uma das manifestações clínicas da infecção pelo *Schistosoma*, sendo considerada uma síndrome toxêmica grave (COLLEY et al., 2014).

Clinicamente essa fase da doença é dividida em pré-postural e pós-postural. A fase aguda pré-postural tem início com a penetração das cercárias através da pele do hospedeiro definitivo, podendo desencadear um quadro de dermatite cercariana (LAMBERTUCCI, 2010). Essa fase apresenta sintomatologia inespecífica combinada com uma série de eventos imunológicos como reação de hipersensibilidade mediada por IgE, resposta imune anti-esquistossômulo e produção de anticorpos IgM, IgG e IgA (LAMBERTUCCI, 2010).

A fase aguda pós-postural tem início com a postura dos ovos no sistema porta hepático, sendo caracterizada por uma sintomatologia inespecífica (febre, náuseas, cefaleia, anorexia, calafrios, tosse, sudorese e diarreia) acompanhada de leucocitose, eosinofilia, hepatoesplenomegalia e uma resposta imune celular exacerbada aos antígenos do *Schistosoma* especialmente antígenos provenientes dos ovos (COLLEY et al., 2014; PEREIRA et al., 2016).

. A maioria dos sintomas exibidos durante essa fase está associada à espécie infectante de *Schistosoma*, a carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imune eficiente (COELHO; ENK; KATZ, 2009; JAURÉGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2009).

A maioria dos indivíduos residentes em área endêmica para a esquistossomose são portadores da infecção crônica, que ocorre por volta do sexto mês após a exposição, podendo evoluir para as diferentes formas clínicas da doença. A forma clínica intestinal é a mais frequente, caracterizada por episódios ocasionais de diarreia mucossanguinolenta com dor ou desconforto abdominal; a forma clínica hepatointestinal, além dos sintomas intestinais, também apresenta hepatomegalia, já a forma clínica hepatoesplênica, pode manifestar-se sob duas diferentes formas, a forma compensada, onde é observado um quadro de hepatoesplenomegalia com menor grau de hipertensão portal, ou a forma descompensada, que apresenta circulação colateral, varizes esofagianas com anemia acentuada, desnutrição e hiperesplenismo (OLVEDA et al., 2014).

No curso evolutivo da esquistossomose é possível dividir a resposta imune em duas fases polarizadas, sendo a primeira caracterizada por um perfil Th1 e a segunda caracterizada por um perfil Th2 e uma terceira fase de imunomodulação,

relacionada com o aumento do número e atividade das células T regulatórias (Treg) na fase crônica da doença. Durante a fase de migração dos vermes nos tecidos do hospedeiro definitivo (3 a 5 semanas), observa-se uma intensa expressão de citocinas pró-inflamatórias de padrão Th1 como interleucinas 1 (IL-1) e 12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) (CHUAH et al., 2014). Com a maturação dos parasitos, acasalamento e início da postura dos ovos (entre 5 e 6 semanas), ocorre atenuação da resposta Th1 e o aumento de uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, bem como a produção de imunoglobulina E (IgE). Esta resposta é fortemente induzida pelos antígenos dos ovos (CHUAH et al., 2014; WILSON et al., 2007).

O maior dano tecidual observado na esquistossomose está relacionado com a resposta inflamatória granulomatosa, que ocorre em torno dos ovos vivos liberados pela fêmea de *S. mansoni* (WILSON et al., 2007). Os ovos são liberados no lúmen intestinal, porém, muitos ficam retidos em órgãos como fígado, baço, intestino, pulmões e pâncreas. Os ovos excretam um antígeno solúvel (*Soluble Egg Antigens - SEA*) que induz tanto a resposta imune humoral quanto a celular (FAIRFAX et al., 2012; TANG et al., 2017), sendo responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional que promoverá a formação do granuloma, fibrose hepática e hipertensão portal, podendo evoluir para o óbito (WILSON et al., 2007). O granuloma esquistossomótico é uma coleção compacta e organizada de células inflamatórias, que junto com células residentes do órgão afetado, secretam e dispõem-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterogênea, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente. Inicialmente acumulam-se em torno dos ovos numerosos macrófagos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e alguns plasmócitos, onde se observa intenso processo inflamatório e regiões de necrose tecidual (TOFFOLI DA SILVA et al., 2016). Os granulomas que se desenvolvem no sistema porta-hepático fígado, levam ao desenvolvimento de um manguito fibroso em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta, quadro conhecido como fibrose periportal. A fibrose periportal provoca obstrução dos ramos intra-hepáticos, tendo como consequência hipertensão portal, a manifestação mais grave da esquistossomose, podendo causar alterações como esplenomegalia, varizes esofagianas e ascite (barriga d'água) (BARRETO et al., 2016). Apesar da resposta Th2 modular a resposta Th1 e reduzir o tamanho dos granulomas, ela também está relacionada ao desenvolvimento de fibrose hepática

na fase crônica da doença, sendo as citocinas IL-13, IL-15 e IL-17 as principais responsáveis pela indução da fibrogênese tecidual (CHUAH et al., 2014; DE RUITER et al., 2017; FAIRFAX et al., 2012).

Vários estudos indicaram que ambas as respostas Th1 e Th2 devem ser moduladas para evitar danos ao hospedeiro, sendo a citocina IL-10 a principal responsável pelo efeito modulador das respostas inflamatórias (FAIRFAX et al., 2012; ALLAM et al., 2016).

2.1.2 Controle e Tratamento da Esquistossomose

O controle da esquistossomose tem sido um desafio constante para as regiões endêmicas e para os serviços de saúde pública, principalmente devido a dificuldades na prevenção da infecção precoce e reinfeção frequente. Várias estratégias como controle ambiental do hospedeiro intermediário, provisão de água potável e tratamento médico, foram usadas isoladamente e em combinação (ANDRADE et al., 2017).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, hospedeiros intermediários. A partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o principal objetivo passou a ser o controle da morbidade, com ênfase no tratamento quimioterápico (CRELLEN et al., 2016). A quimioterapia tem sido a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença. Contudo, a estratégia atual é conjugar o controle quimioterápico com medidas preventivas, como a educação em saúde e o saneamento, além do controle dos hospedeiros intermediários, por meio do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático (MENDONÇA et al., 2016).

O PZQ, um derivado sintético da pirazina isoquinolina é um medicamento altamente eficaz com um bom perfil de segurança e um amplo espectro contra as infecções por helmintos e continua sendo o medicamento de escolha para a quimioterapia da esquistossomose há quase 40 anos (BERGQUIST; UTZINGER; KEISER, 2017)

O PZQ começa a atuar cerca de uma hora após sua administração, provocando paralisia e contrações musculares do parasito, dano tegumentar e

aumento na exposição de antígenos na superfície do parasito. Seus efeitos colaterais podem variar de acordo com os indivíduos, mas normalmente são leves, incluindo náuseas, vômitos, mal-estar e dor abdominal, podendo ocorrer alguns efeitos mais severos incluindo diarreia sanguinolenta e urticária edematosa observada em área com altas intensidades de infecções que podem ser devido à liberação de antígenos e outros metabólitos através da morte vermes (GRYSEELS et al., 2006; VALE et al., 2017).

Apesar de muitos anos de uso e o tratamento de milhões de pessoas, o mecanismo (s) de ação de PZQ ainda não foi estabelecido. No entanto, os primeiros efeitos exercidos pelo PZQ nos vermes adulto são: (i) influxo de cálcio, (ii) contração muscular e (iii) modificações no tegumento (CIOLI et al., 2014).

O Ministério da Saúde utiliza o PZQ produzido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz), que é apresentado em comprimidos de 600 mg, administrados por via oral e recomenda uma dose única de 50 mg/kg de peso corporal para adolescentes acima de 15 anos e adultos e 60 mg/kg para crianças de até 15 anos (BRASIL, 2010). Após o tratamento, são relatadas taxas de cura de até 60% durante a fase aguda e 90% durante a fase crônica, com redução da contagem de ovos acima de 90% entre os não curados (CIOLI et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006; KATZ; COELHO, 2008). Nas populações expostas às reinfecções, com número de ovos elevado, a taxa de cura pode ser reduzida, podendo a dose do medicamento ser aumentada e fracionada (DAVIS, 1993).

Apesar de o PZQ ser o fármaco esquistossomicida disponível para o tratamento da doença, sendo eficiente e apresentando poucos efeitos colaterais, alguns aspectos relevantes devem ser considerados, tais como: (i) o PZQ é um medicamento que apresenta poucos efeitos sobre ovos e vermes imaturos do *Schistosoma*, (ii) apresenta sob a forma de uma mistura racêmica de dois estereoisômeros, sendo que apenas um é dotado de propriedades esquistossomicidas, enquanto o outro contribui com a ocorrência de efeitos colaterais, sendo também responsável pelo sabor desagradável da medicação, (iii) sugere-se, também, que baixos índices de cura em algumas regiões possam manifestar uma falsa resistência/tolerância, sendo as altas taxas de infecção e reinfecção, em grandes proporções, os principais responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (COLLEY et al., 2014).

Além disso, a dependência de um único fármaco para o tratamento de uma doença com o significado público global da esquistossomose corre o risco de desenvolver e disseminar a resistência aos medicamentos, especialmente porque a susceptibilidade reduzida tem sido demonstrada no campo e no laboratório (VALE et al., 2017).

KATZ et al. (1991) e GOMES et al. (1993) observaram a ineficácia do tratamento, com PZQ, em indivíduos acometidos pela esquistossomose. Entretanto, o primeiro relato de resistência a esse fármaco foi descrita por FALLON; DOENHOFF, (1994) em laboratório. A partir disso, alguns estudos têm sugerido a existência de resistência ao PZQ (BONESSO-SABADINI; DE SOUZA DIAS; DIAS, 2002). Sugere-se também, que baixos índices de cura em algumas regiões, possam ser atribuídos à alta carga de vermes, altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença em grandes proporções, de vermes imaturos, responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (COLLEY et al., 2014).

Uma diminuição na magnitude do dano causado no tegumento dos vermes resistentes quando comparado aos sensíveis foi também observada (WILLIAM et al., 2001). Resistência ou menor susceptibilidade do parasita aos medicamentos esquistossomóticos é um fato. No entanto, no presente, resistência a drogas não parece ter importância para a saúde pública, mas será necessário para o futuro (KATZ; COELHO, 2008).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS E A ESQUISTOSSOMOSE

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A quimioterapia repetida da esquistossomose resultou no surgimento de cepas resistentes de *Schistosoma*. O desenvolvimento dessa resistência tem chamado a atenção de muitos autores por fármacos alternativos. Muitas plantas medicinais têm sido estudadas para investigar seu potencial esquistossomicida (TEKWU et al., 2017).

A busca de compostos antiparasitários de fontes naturais tem aumentado ao longo da última década (ALI et al., 2016; KAPADIA et al., 2017; ROCHA et al., 2017; TEKWU et al., 2017). E as plantas continuam a ser uma importante fonte de compostos biologicamente ativos que podem fornecer estruturas para o desenvolvimento de novos fármacos (DE ALMEIDA et al., 2016). As plantas medicinais têm sido utilizadas em todas as culturas como fonte de medicamento, como base natural para a manutenção de uma boa saúde. Assim, exemplos como o *Baccharis trimera* conhecida popularmente como carqueja (DE OLIVEIRA et al., 2014a), episopiloturine uma substância isolada da planta *Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente com jaborandi (GUIMARÃES et al., 2015), *Zingiber officinale* mais conhecido como gengibre (MOSTAFA; EID; ADLY, 2011), *Allium cepa* popularmente conhecido como alho (RIAD; TAHA; MAHMOUD, 2013) e *Mentha vilosa* popularmente conhecida como hortelã (MATOS-ROCHA et al., 2016), tem sido estudado como produtos naturais com atividade esquistossomicida.

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA 7-EPICLUSIANONA

A 7-epi é uma benzofenona tetraisoprenilada (Figura 2) isolada pela primeira vez dos frutos de *Rheedia gardneriana* (DOS SANTOS et al., 1999). Segundo SANTA-CECÍLIA et al., (2011, 2012) a 7-epi tem notáveis atividades anti-inflamatória e analgésica. Sendo capaz de regular a liberação do ânion superóxido da inflamação, através de um mecanismo controlado por fosforilação da proteína tirosina e por uma estimulação direta da proteína quinase C.

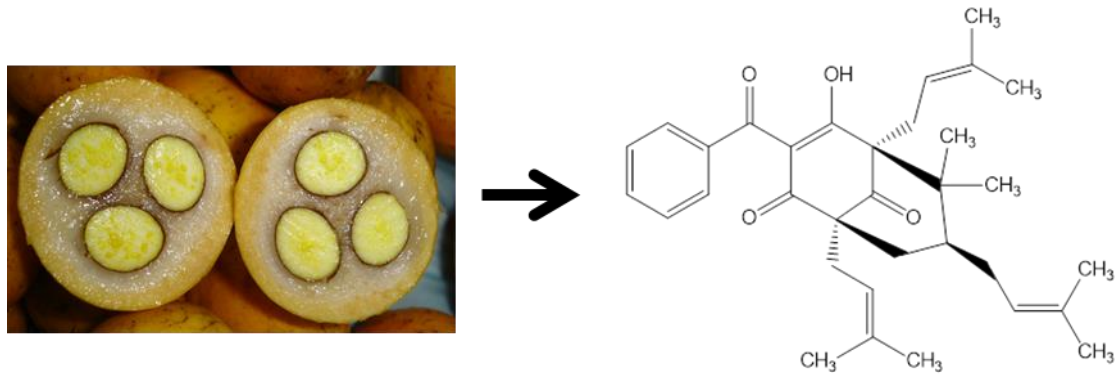


Figura 2 – Frutos de *Garcinia brasiliensis* e estrutura química da benzofenona 7-epiclusianona

Fonte: Da autora.

Dados mostram que a 7-epi, perturba o metabolismo do açúcar extracelular e intracelular de *Streptococcus mutans*, sendo um composto natural responsável por prevenir doenças relacionadas com a formação de placas bacterianas em cavidade oral, podendo ser um potente agente farmacológico para a prevenção e controle da cárie dentária (MURATA et al., 2010).

A atividade antimicrobiana da benzofenona prenilada 7-epi foi avaliada em relação a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e as culturas de *Bacillus cereus*. A relação direta entre o caráter lipofílico da estrutura e da atividade em bactérias gram-positivas foi observada (NALDONI et al., 2009).

Estudos feitos por MARTINS et al. (2009) confirmaram as relações estrutura-atividade, das três benzofenonas pentapreniladas a gutiferona A, a 7-epi e a garcinofenona como substâncias com atividades antitumorais.

A 7-epi é um agente natural promissor que apresenta múltiplos efeitos inibitórios na proliferação de células cancerosas *in vitro* (MURATA et al., 2010). Segundo MURATA et al. (2010) a toxicidade de 7-epi foi investigada através de avaliação histológica dos diversos órgãos obtidos de ratos. Exames em ratos revelaram que o estado nutricional e o desenvolvimento foram normais não havendo diferença significativa no ganho de peso entre os grupos, a pele e orifícios naturais não apresentaram alterações morfológicas. Macroscopicamente e microscopicamente observação do coração, pulmão, pâncreas, baço, fígado, estômago, rins, intestino, ovário, cérebro, olhos, língua, tecido palatal e glândulas submandibulares não demonstrou haver diferença entre os grupos experimentais e não havia sinais detectáveis de alterações patológicas.

Resultados revelam que a 7-epi, produz resposta ativa contra anafiláticos sendo considerada como modelo molecular na descoberta de medicamentos para as síndromes alérgicas (NEVES et al., 2007). A administração oral de 7-epi reduz episódios de obstrução brônquica, podendo ser eficaz no tratamento da asma (COELHO; SERRA, 2008).

2.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO

Estabilidade química de moléculas farmacêuticas é uma questão de grande preocupação, pois afeta a segurança e eficácia do medicamento. As orientações da FDA (**Food and Drug Administration**) e ICH (“International Conference on Harmonisation”) indicam a necessidade de dados de teste de estabilidade para compreender como a qualidade de uma substância muda com o tempo sob a influência de vários fatores ambientais (BLESSY et al., 2014).

Degradação forçada é um processo que envolve a degradação de fármacos em condições mais severas do que as condições aceleradas e, portanto, gera produtos de degradação que podem ser estudados para determinar a estabilidade da molécula. A diretriz ICH afirma que testes de estresse se destinam a identificar os produtos de degradação mais prováveis, o que permite a caracterização da estabilidade intrínseca da molécula e a determinação das vias de degradação (“International Conference on Harmonisation (ICH)”, 1999).

A estabilidade de uma preparação farmacêutica está relacionada com a sua potência, por conseguinte, com as suas propriedades terapêuticas. A degradação química do componente ativo, muitas vezes resulta numa perda de potência, ou em alguns casos, na formação de produtos de degradação com potencial de toxicidade. Sendo assim, a utilização clínica de uma preparação farmacêutica não pode ser recomendável se a degradação é relativamente alta (DIEGO et al., 2011).

Diferentes fatores podem afetar a estabilidade do fármaco e da forma farmacêutica. Estes fatores podem ser intrínsecos relacionados à estrutura química do fármaco e à fatores extrínsecos, tais como temperatura, luz, umidade e oxigênio (DIEGO et al., 2011).

A estabilidade intrínseca de fármacos pode ser avaliada usando estudos de degradação forçada em diferentes condições de estresse forçada. Métodos

indicativos de estabilidade possuem a seletividade como seu principal atributo, permitindo separar e detectar o fármaco na presença dos seus produtos de degradação. Estes métodos de análise são aplicados para estimar e confirmar o prazo de validade de formulações farmacêuticas em estudos de estabilidade de medicamentos comerciais e também são uma ferramenta auxiliar no delineamento de novas formulações (JAIN; BASNIWAL, 2013; RAO et al., 2013). Na análise de rotina, os métodos de ensaio indicando estabilidade têm como objetivo avaliar se o fármaco está se degradando durante o processo de fabricação ou durante o armazenamento. A quantidade de fármaco no produto farmacêutico e as porcentagens de produtos de degradação podem ser avaliadas usando estes métodos analíticos indicativos de estabilidade. Apesar da importância destes ensaios, o desenvolvimento destes métodos analíticos não é uma tarefa simples, requerendo vários ensaios laboratoriais para assegurar a separação e a detecção dos produtos de degradação (RUELA et al., 2014).

Uma vez que os produtos naturais vêm sendo amplamente estudados com o objetivo de descobrir novos compostos para tratamento de diversas doenças, é de grande importância estudos para avaliar a estabilidade desses compostos, bem como a caracterização dos seus produtos de degradação. Como exemplos, pode-se mencionar a saikosaponin A (LI; XU; JIANG, 2016), quercetina (PAKADE; LESAOANA; TAVENGWA, 2016), artemisina (HALL et al., 2016) que tiveram a sua estabilidade e seus produtos de degradação caracterizados.

2.5 ENSAIOS FARMACOCINÉTICOS

A ação de um fármaco, quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica. Na fase farmacêutica ocorre a desintegração da forma de dosagem, seguida da dissolução da substância ativa. A fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), ou seja, "o que o organismo faz com o fármaco". A fase farmacodinâmica está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo (receptor, enzimas etc.) e a consequente produção do efeito terapêutico e pode ser entendida como "o que o fármaco faz no organismo" (PEREIRA, 2007).

Nota-se que a fase farmacocinética pode ter profundo impacto sobre o efeito farmacológico, uma vez que os processos de ADME determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação (GANNON et al., 2016).

As pesquisas de fármacos concentram seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica. Triagens preliminares usam modelos *in vitro*, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista. A partir destes estudos, triagens secundárias e terciárias frequentemente são dirigidas à administração do composto a animais, por via oral ou intravenosa, com observação do efeito farmacológico. Entretanto, muitos dos compostos que se mostram promissores nos testes *in vitro* não apresentam boa atividade em animais. Esta falha de correlação, muitas vezes associada a problemas farmacocinéticos dos compostos, como baixa biodisponibilidade, duração de ação (muito curta ou muito longa), ou a presença de metabólitos inativos, pode levar a programas clínicos mal sucedidos (PEREIRA, 2007).

Sem dúvida, compostos isolados de plantas têm sido a fonte mais consistente e bem sucedida de protótipos a fármaco, porém se faz necessário o conhecimento do comportamento dessas substâncias dentro do organismo. Assim, estudos para avaliar os parâmetros farmacocinéticos dessas substâncias, tais como, Calebin A (OLIVEIRA et al., 2015), Saponinas (LIU et al., 2014), alcaloides, flavonas e antraquinonas (ZHANG et al., 2014), vem sendo amplamente difundidos.

O processo de descoberta de fármacos é muito lento e dispendioso. Uma das abordagens para o encurtamento do tempo está na disposição farmacocinética *in vivo*. Muitos candidatos fármacos que apresentam propriedades *in vitro* pode falhar em testes de disposição *in vivo*. O perfil de ADME de uma molécula de potencial deve ser conhecido para poder entrar no mercado (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003). Portanto, é importante este tipo de estudo com o intuito de conhecer o perfil farmacocinético da 7-epi, levando em consideração que suas atividades farmacodinâmicas vem sendo amplamente estudadas.

2.6 ESTUDOS DE TOXICIDADE

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus constituintes podem ter efeitos tóxicos e o metabolismo vegetal

também pode gerar metabólitos com esta mesma atividade (SOUSA; VICCINI, 2011). Assim, a aplicação indiscriminada de plantas medicinais e seus constituintes, sem o conhecimento citotóxico, o potencial genotóxico e mutagênico de seus compostos podem representar riscos para a saúde humana (SOUSA; SILVA; VICCINI, 2010).

2.6.1 Marcadores Bioquímicos de Toxicidade

A ação tóxica de uma substância pode muitas vezes comprometer alguns órgãos. O fígado é o local inicial de contato para muitos tipos de substâncias ingeridas oralmente, tornando assim este órgão particularmente susceptível a lesão induzida por produtos químicos (GU; MANAUTOU, 2012). O fígado está envolvido numa grande variedade de funções, incluindo o metabolismo de energia, desintoxicação, armazenamento de glicogênio, produção de hormônios, e síntese de proteínas (XU et al., 2015).

O diagnóstico de doenças hepáticas muitas vezes é confirmado pelo exame histopatológico e exames laboratoriais. O perfil inicial de provas de função hepática pode ser constituído pela determinação das enzimas transaminases: aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), entre outras (WORETA; ALQAHTANI, 2014).

As aminotransferases AST e ALT são enzimas intracelulares que se encontram praticamente em todos os tecidos (miocárdio, músculo esquelético, rins, pâncreas, baço cérebro e pulmão), porém em maior concentração nas células hepáticas. São biomarcadores frequentemente utilizados para avaliar doenças hepáticas. A ALT é predominantemente expressa pelos hepatócitos, enquanto que a AST é expressa principalmente por ambas as células miocárdicas e hepatócitos. Um aumento nos níveis de ALT e AST no soro geralmente reflete diferentes graus de lesão hepática. Como resultado, mudanças nos níveis de ALT e AST no soro são úteis marcadores sorológicos para o diagnóstico de doenças hepáticas e para a avaliação da eficácia terapêutica e efeitos hepáticos adversos do tratamento. Por conseguinte, a aplicação de um valor limite superior ótimo para os níveis séricos de ALT e AST é de particular importância devido à sua alta relevância clínica (ZHANG, 2015).

As dosagens de albumina e proteína sérica total são empregadas para avaliar a função específica de síntese do fígado. Uma diminuição nestes parâmetros está presente em casos de alterações hepáticas, onde o fígado deixa de produzi-las, ou em casos de alterações renais, onde há perda de proteína pelos túbulos renais (ABOU-ZIED et al., 2014; ELSHEIKHA; HUSSEIN; RAHBAR, 2008).

A dosagem de glicose sérica contribui para avaliar o dano hepatocelular já que fígado é um órgão de suma importância na manutenção da glicemia, pois os hepatócitos têm a função de converter os produtos originários da digestão e metabolização tecidual endógena (Glicólise a partir de aminoácidos e glicerol) em glicose e outros produtos; também converte a glicose em glicogênio e regula o nível glicêmico sanguíneo (THRALL M.A. et al., 2015).

A glicose é a principal fonte nutricional explorada pelo *S. mansoni* que dependem principalmente da glicólise para geração de energia. Os parasitas adultos consomem grandes quantidades de glicose sendo essencial para o crescimento e fecundidade, conseqüentemente níveis baixos de glicose são encontrados em seus hospedeiros. (HOWE et al., 2015; WORETA; ALQAHTANI, 2014; YOU et al., 2015).

Para estimar o ritmo de filtração glomerular, na avaliação da função renal, pode-se usar a creatinina sérica. A deterioração ocorre quando os valores estão aumentados, sendo que o nível sérico geralmente acompanha, paralelamente, a severidade da doença renal (KIRSZTAJN, 2007).

A excreção de creatinina só é realizada por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal (KIRSZTAJN, 2007).

2.6.2 Genotoxicidade Versus Antigenotoxicidade e Mutagenicidade Versus Antimutagenicidade

O DNA sofre frequentes agressões por substâncias exógenas e endógenas, porém as células possuem sistemas enzimáticos que são capazes de reparar a grande maioria desses danos. Esses sistemas são muito eficientes, porém algumas lesões ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA não são reparados, podendo resultar em evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de iniciação de um processo carcinogênico (GOODSON et al., 2015).

As alterações genéticas podem ser de três tipos principais: (1) alterações no DNA conhecidas como mutação de ponto, (2) alterações da estrutura de cromossomos, tais como quebras e rearranjos e (3) separação desigual dos cromossomos durante a divisão celular. Essas alterações são conhecidas como iniciação, que é seguida das etapas de promoção, progressão e manifestação (GU; ZHANG; LUPSKI, 2008; TAO et al., 2008b) (Figura 3).

A interação do agente químico com o DNA da célula-alvo corresponde com a iniciação, levando à mutação; a promoção caracteriza-se pela proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, como os focos de células alteradas. A progressão por sua vez é caracterizada morfológicamente por anaplasia e biologicamente por crescimento autônomo. Quando as células adquirem a capacidade de invadir e metastatizar e todas essas alterações forem evidenciadas clinicamente, ter-se-á a última etapa, a manifestação. A correlação observada entre a mutagenicidade e a carcinogenicidade é consistente com a teoria de que o câncer é causado por mutações somáticas (TANAKA, 2009).

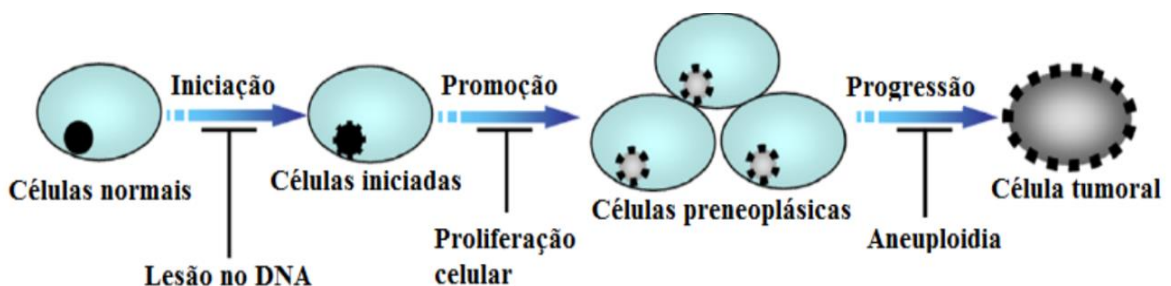


Figura 3 - Etapas da carcinogênese.
Fonte: TAO et al (2008).

A Genética Toxicológica é uma das áreas da ciência que tem se dedicado a pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos, fazendo uso de diversos ensaios que avaliam o dano que estes podem vir a causar ao DNA na presença ou ausência de sistemas de metabolização (COSTA et al., 2008). Para avaliar a segurança no uso dessas substâncias, são utilizados testes de genotoxicidade como o ensaio cometa e mutagenicidade como o teste do micronúcleo (MN), *in vivo* em geral são usadas células de mamíferos, geralmente camundongos. Deste modo, estudos de genotoxicidade ajudam na avaliação da segurança e efetividade dos produtos

naturais (BAST et al., 2002). Tendo em vista que os agentes mutagênicos estão direta ou indiretamente ligados a carcinogênese (PAPAMOKOS; SILINS, 2016).

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos, podendo resultar em mudanças hereditárias ao organismo (ZEIGER, 2007). Muitas mutações passam despercebidas, pois não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo, mesmo aquelas que resultam em morte celular. À medida que aumenta a quantidade de substâncias atribuídas ao consumo humano, se torna imprescindível a identificação dos potenciais agentes mutagênicos (BRASILEIRO-VIDAL, 2015). Substâncias que são capazes de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, são consideradas antimutagênicas (AKIN et al., 2016).

Os testes de genotoxicidade e mutagenicidade fazem parte da bateria de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2010). VALENTIN-SEVERIN (2003) salientaram que a diferença entre os testes do cometa e do MN consiste basicamente no tipo de alteração detectada no DNA. Enquanto o teste do cometa detecta lesões primárias, que muitas vezes são reparáveis, o teste do MN detecta lesões irreparáveis.

A doxirrubicina (DXR) é um fármaco produzido por uma variante do fungo *Streptomyces peucetius*, pertencente a classe das antraciclinas de classe I não seletiva, que inibe tanto a síntese de DNA quanto de RNA e tem sido usado neste tipo de estudo com controle positivo. Possui um amplo espectro de atividade antitumoral e é amplamente utilizada no tratamento de linfomas, leucemia câncer de mama, pulmão, ovário e de estômago e nas malignidades da tireoide. Além de formar radicais livres, a DXR tem capacidade de alquilar diretamente o DNA, induzindo a formação de ligações entre as duas fitas de DNA. Tendo como consequência a indução de aberrações cromossômicas, desenvolvimento de tumores e degeneração celular (CAGEL et al., 2017).

A variação nas drogas e vias de administração ocorrem em função do que se deseja induzir e local de ação. Assim, delineamentos direcionados para o cólon utilizarão DMH e o direcionado para mutagenicidade em sangue periférico, medula óssea e fígado utilizarão a DXR. Os estudos de mutagenicidade e lesões pré-neoplásicas serão de curta duração compreendendo a fase de iniciação do câncer.

2.6.2.1 Ensaio Cometa

Ensaio cometa, também chamado Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) consiste em uma técnica simples e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizada na genética toxicológica por ser um ótimo método capaz de detectar um amplo espectro de danos no DNA, ser adaptável a diversas espécies, sensível, rápido e de baixo custo (COLLINS, 2014). O mecanismo principal, proposto por OSTLING e JOHANSON, (1984) é que o DNA é organizado em grandes estruturas superenoveladas que, quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, podem migrar para o ânodo através da eletroforese. A aparência dos nucleóides submetidos ao teste levou Olive em 1989 a sugerir o nome “*Comet Assay*” (DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009; TICE et al., 2000).

SINGH et al., (1988), apresentaram mais tarde, algumas modificações no protocolo do teste cometa, incluindo eletroforese em pH alcalino (pH>13) e uma digestão proteica mais completa, tornando a técnica mais sensível e a mais utilizada pelos pesquisadores da área (TICE et al., 2000). Nestas condições, a técnica permite detectar um mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla. O Ensaio Cometa tornou-se cada vez mais popular para mediar a dimensão e heterogeneidade dos danos causados por agentes genotóxicos em populações de células individuais. Para detectar o DNA, as lâminas são coradas e examinadas por microscopia de fluorescência. Diferentes técnicas para quantificar cometas têm sido relatadas, que vão desde a simples medição do comprimento da cauda a cálculos mais complexos (AQUINO; PERAZZO; MAISTRO, 2011). Os cometas gerados (tamanho, intensidade da fluorescência, aspecto e outras características) podem ser analisados visualmente ou de maneira automatizada, com programas computacionais próprios, sendo bastante concordantes os resultados fornecidos pelas duas formas de análise (AZQUETA et al., 2014). Para interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido entre cabeça e cauda. Assim células sem ou com pouco dano no DNA, não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. Segundo COLLINS et al., (2008) os cometas são divididos em quatro classes de acordo com a extensão do dano gerado (Figura 4):

- *Cometa classe 0* – nucleóides que não apresentam cauda;
- *Cometa classe 1* – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide;

- *Cometa classe 2* – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide;
- *Cometa classe 3* – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide.

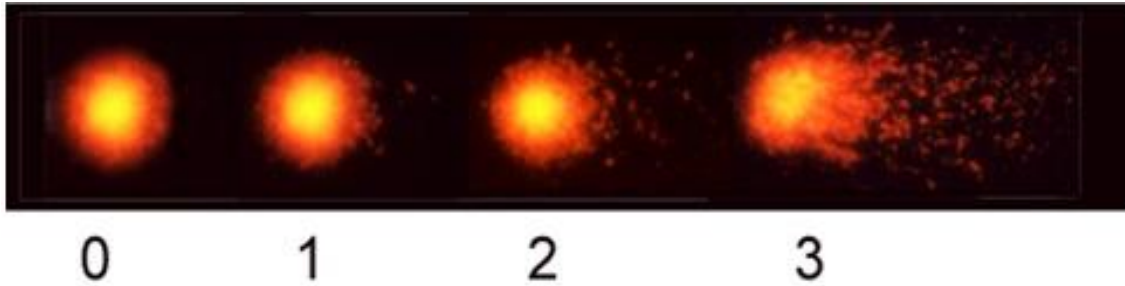


Figura 4 - Classificação dos cometas. Nucleóides que não apresentam cauda (classe 0), nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide (classe 1), nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide (classe 2), nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide (classe 3).
Fonte: CORTÉS-GUTIÉRREZ et al (2012).

Comparada com outras técnicas, o ensaio cometa apresenta algumas vantagens, dentre elas: (1) apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA; (2) requerimento de baixo número de células por amostras; (3) flexibilidade; (4) baixo Custo; (5) fácil aplicação; (6) habilidade de conduzir estudos utilizando pequena quantidade de substância; e (7) tempo relativamente curto para a realização de experimentos (TICE et al., 2000).

2.6.2.2 Testes de Micronúcleo (MN)

O MN é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (ARALDI et al., 2015).

O MN constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os MN são formados durante a telófase da mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de

cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (ARALDI et al., 2015).

Os MN são formados durante a mitose (Figura 5), independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Conseqüentemente, a comparação da frequência de MN entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica. Os MN são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico. São formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase. Sistemas *in vitro* podem ser realizados com diversas linhagens celulares e são eficientes para detectar efeitos clastogênicos e aneugênicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

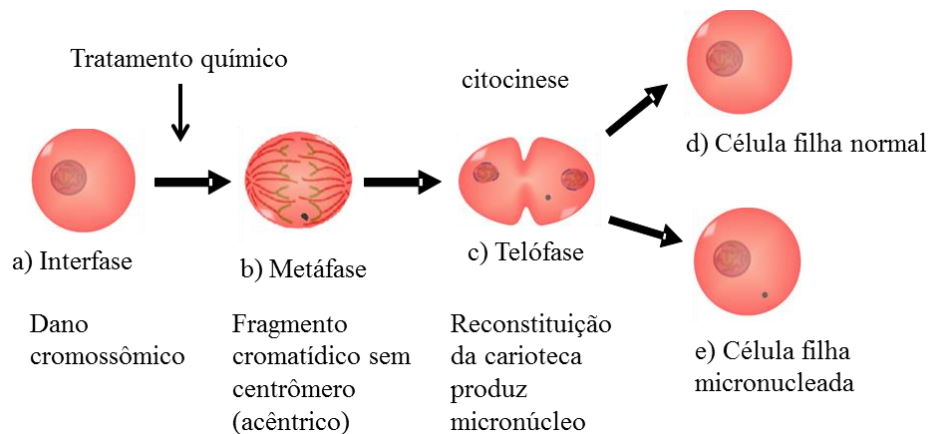


Figura 5 - Processo de formação do micronúcleo.
Fonte: KIRSCH-VOLDERS et al (2011).

2.6.2.3 Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada executada por caspases, que são enzimas específicas que participam na cascata de sinalização que culminam na remoção rápida de organelas e outras estruturas celulares. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos

moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

Durante a apoptose a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, como retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (MUKHOPADHYAY et al., 2014)

A maioria dos estímulos desencadeia a apoptose por ação das caspases, grupo de enzimas proteolíticas (cystenil aspartate specific proteases) sintetizadas como pró-enzimas inativas. Dentre as 14 caspases humanas descritas até o momento, a caspase 3 faz parte do grupo de caspases envolvidas diretamente na apoptose, dentre o grupo das caspases efetoras (3, 6 e 7). O equilíbrio entre a cascata das caspases, indutoras da morte celular e as proteínas inibidoras da apoptose, que inibem as caspases iniciadoras e efetoras, constituem ponto fundamental no processo apoptótico. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (LEE et al., 2012).

Estudos demonstram que compostos de origem natural (RAHMAN et al., 2016, CHANG et al., 2016, KYRIAZIS et al., 2016) vem sendo amplamente estudados com o intuito de avaliar suas atividades antitumorais mediadas pela modulação das vias de morte celular, incluindo a apoptose em células tumorais. Portanto os compostos naturais podem proporcionar novas oportunidades para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, uma vez que podem modular as vias da apoptose, que são frequentemente bloqueadas em células tumorais. Portanto é importante avaliar se essas substâncias não induzem apoptose em células normais, portanto há um crescente interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos derivados de compostos naturais.

Antes da aprovação de novos produtos farmacêuticos naturais é de grande importância avaliar os seus efeitos toxicológicos, de modo que apenas a substância isenta de potenciais efeitos mutagênicos deverá ser introduzida no mercado. Vários

estudos vêm sugerindo que os agentes mutagênicos produzem efeitos cancerígenos (AQUINO; PERAZZO; MAISTRO, 2011).

Estudos feitos pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou significativa atividade esquistossomicida *in vitro* da 7-epi, apresentando ED₁₀₀ de 14.0 mg/Kg sendo que nesta concentração foi capaz de causar paralisia total dos vermes machos e fêmeas, efeito sobre a aptidão reprodutiva, interferência na atividade excretora observado utilizando a sonda resorufin, graves lesões no tegumento dos vermes adultos observado utilizando as sondas Hoechst 33258. Na concentração 12.5 µg/mL apresentou atividade contra cercárias e esquistossômulos (CASTRO et al., 2015). A 7-epi demonstrou ser um composto esquistossomicida promissor, porém testes *in vivo* são necessários para elucidar o mecanismo (s) de ação e avaliar a sua adequação para a descoberta de novos agentes anti-helmínticos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho serão apresentados a seguir.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade química, os efeitos farmacocinéticos, toxicológicos e esquistossomicidas da 7-epi uma substância isolada do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis*, no contexto da atividade *in vivo* no hospedeiro definitivo usando modelos murinos não infectados e infectados com *S. mansoni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a estabilidade da 7-epi por meio dos testes de degradação forçada e a caracterização do produto de degradação.
- b) Avaliar a estabilidade química e plasmática, a biodisponibilidade e o perfil farmacocinético usando modelos murinos não infectados e infectados com *S. mansoni*.
- c) Avaliar a toxicidade por meio de ensaios bioquímicos (provas de função hepática e renal), ensaios histopatológico do fígado e ensaios genotóxicos e mutagênicos (ensaio cometa, micronúcleo e apoptose) usando modelos murinos não infectados e infectados com *S. mansoni*.
- d) Avaliar a atividade esquistossomicida, por meio da avaliação parasitológica (recuperação e viabilidade dos vermes adultos, oograma, contagem de ovos no e intestino).
- e) Avaliar através de testes histopatológicos a atividade da 7-epi frente aos ovos de *S. mansoni* presentes no fígado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho serão apresentados a seguir.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As atividades realizadas com a 7-epi neste estudo estão esquematizadas na Figura 6.

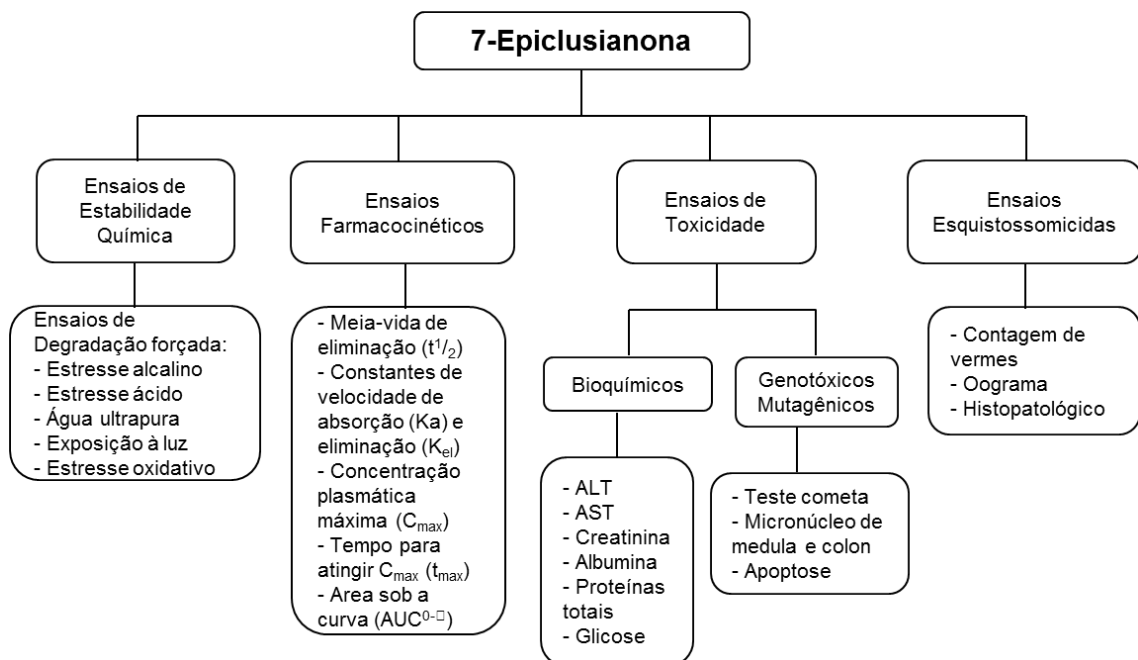


Figura 6 – Fluxograma das atividades realizadas com a 7-epiclusianona.
Fonte: Da autora.

4.2 OBTENÇÕES DA 7-EPICLUSIANONA

Para obtenção da 7-epi foi usado o epicarpo das sementes dos frutos de *G. brasiliensis*.

4.2.1 Local de Execução

O trabalho foi, desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) e no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (LBMM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

4.2.2 Coleta do Material Vegetal

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14" sul e longitude 42° 52' 55" oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa.

4.2.3 Preparo do Extrato, Isolamento e Purificação da Substância

Os epicarpos dos frutos de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C durante 8 dias com monitoramento de perda de água. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas, fornecendo 1000 g e submetido à extração por remaceração em 3000 mL de hexano, a temperatura ambiente. Foram filtrados e secos usando um rotavapor à pressão reduzida. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes.

Para isolar a 7-epi o extrato hexânico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi cromatografado em colunas de sílica gel (CC) (230-400 mesh) (8 x 100 cm) e eluída com misturas de polaridade crescente de hexano/acetato de etila e acetato de etila/etanol sendo as frações concentradas em rotavapor à pressão reduzida. Estas frações foram reunidas em grupos de acordo com suas semelhanças após a análise por cromatografia em camada fina (TLC). Quando necessário, foram recromatografadas e, ou recristalizadas em metanol para obtenção do composto puro, cujos padrões foram usados para sua identificação além dos dados espectrais (GONTIJO et al., 2012; SANTA-CECÍLIA et al., 2011a).

A pureza da 7-epi (99%) foi determinada (Shimadzu UFLC 20), usando uma coluna NST (Nano Separation Technologies) C18–154605 (150 x 4,6mm; 5,0 µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (eluente A) e metanol/ ácido acético 0,1% v/v (eluente B). O volume de injeção foi de 20,0 µL e fluxo de 1,0 mL/min. Durante os 10 minutos

iniciais a análise foi realizada com 50,0% de B, em seguida a concentração de B aumentou linearmente até 100,0% em 20 min e seguiu 100,0% de B até 30 min. Depois a concentração de B foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise. Os cromatogramas foram obtidos em 254 nm e seus picos foram comparados com padrões previamente isolados no laboratório.

O procedimento adotado na elaboração do extrato e da substância isolada está esquematizado na Figura 7.

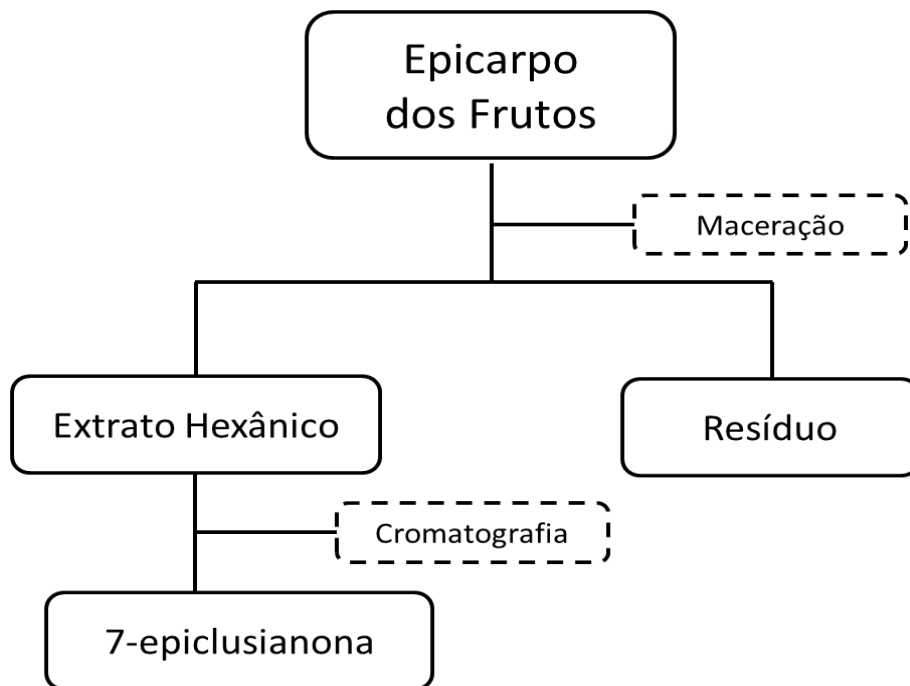


Figura 7 - Esquema da extração e purificação da 7-epiclusianona a partir do epicarpo de *G. brasiliensis*.
Fonte: Da autora.

4.3 ENSAIOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA

Para os ensaios de estabilidade química da 7-epi, foram utilizados os testes de degradação forçada.

4.3.1 Aspectos Gerais

Este estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármaco (LSLF) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa,

a metodologia teve a supervisão da professora Gislaine Ribeiro Pereira e a colaboração do aluno André Luís Morais Ruela.

4.3.2 Reagentes

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. O ácido clorídrico (HCl), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido fosfórico (H₃PO₄) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol para cromatografia líquida foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água para HPLC (cromatografia líquida de alta performance) foi preparada por osmose reversa Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.3.3 Análise por HPLC-UV

As análises foram feitas em HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) série LC-10A constituído por uma bomba LC-20AD, um forno de coluna CTO 20A, um degaseificador DGU 14-A, um detector de agrupamento de fotodiodos (DAD) SPD-M10AVP, um amostrador automático SIL 20-A HT e um controlador SCL-10 AVP. A determinação de 7-epi foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) de fase reversa octadecilsilano (C18) Acqua coluna 150,0 x 4,6 (i.d.) com partículas de 4 µm. Phenomenex pré-coluna C18 Acqua 125 4,0 x 3,0 mm (i.d.) também foi usado. A fase móvel foi preparada a partir de uma mistura de 0,1% (v/v) de solução de ácido fosfórico e metanol (80:20). A taxa de fluxo da fase móvel foi 1,5 mL min⁻¹, volume de injeção foi de 100 µL e a detecção por ultravioleta (UV) foi efetuada a 254 nm, utilizando o detector de PDA (190-450 nm). As amostras foram filtradas utilizando um filtro de seringa de 0,45 µm composto de PTFE modificado (Membranas em Politetrafluoretileno Hidrofílico). O tempo de retenção da 7-epi foi de aproximadamente 10,3 minutos. O tempo total de corrida foi de 16 minutos.

4.3.4 Análise dos Extratos de *G. Brasiliensis*

A determinação de 7-epi foi realizada nos diferentes extratos da planta (etanol, hexano e acetato de etila). Para isso, 10,0 mg de cada extrato foi pesado e diluído em metanol puro para se obter uma solução a 1,0 mg mL⁻¹. Estas soluções

foram diluídas (1:1, v/v) usando uma solução de metanol: água (8:2, v/v). As soluções foram analisadas pelo método de HPLC-UV-VIS (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotométrico operando nas regiões ultravioleta e visível).

Considerando-se o produto de degradação oxidativo da 7-epi, estas soluções preparadas a partir dos extratos (1,0 mg mL⁻¹) foram submetidos ao estresse oxidativo (H₂O₂ a 3%) durante 24 h. Após este tempo, as soluções foram diluídas (1:1, v/v) usando uma solução de metanol:água (8:2, v/v) e estes foram analisados por HPLC-UV-VIS.

4.3.5 Solubilidade da 7-Epiclusianona em Água

As abordagens clássicas para medir a solubilidade foram baseadas no método do balão de agitação de saturação (método de *shaking-flask*), onde um excesso de 7-epi (1mg/mL) foi adicionado ao meio aquoso (5,0 mL) em frasco erlenmeyer e agitado (150 rpm) durante 24 horas em temperatura constante (37°C), feitos em triplicata (n=3). Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado usando um filtro de seringa de 0,45 µm composta por PTFE hidrofílico e diluído em fase móvel (preparada a partir de uma mistura de 0,1% v/v de solução de ácido fosfórico e metanol 8:2, v/v). As concentrações de 7-epi no sobrenadante foram determinada por HPLC-UV-VIS.

4.3.6 Estudos de Degradação Forçada

Diferentes condições de degradação forçada foram avaliadas durante 24 horas a 25°C (em triplicata). Soluções de 7-epi isolado a partir dos extratos de plantas na concentração teórica (padrão) de 100,0 µg mL⁻¹ foram submetidos a estresse alcalino (NaOH 0,1 mol L⁻¹), estresse ácido (HCl 0,1 mol L⁻¹), água ultrapura, exposição à luz (diretamente sobre a luz do dia) e estresse oxidativo (0,3% v/v de H₂O₂). O metanol foi utilizado como co-solvente em todas as soluções (1:1, v/v), devido à baixa solubilidade da 7-epi em água. Amostras do isolado de 7-epi (pó seco) foram expostas ao calor seco (estufa a 105°C durante 6 horas). Depois de submetidas às condições de estresse forçado, as amostras foram analisadas por HPLC-UV-VIS.

A estabilidade intrínseca do composto isolado a partir dos extratos de plantas em soluções aquosas (tampão fosfato isotônico 20 mM, pH 6,8 e pH 7,4) a 37°C também foi avaliada para simular condições fisiológicas. As amostras foram analisadas depois de 8 h (em triplicata).

A percentagem de recuperação (R,%) da substância nos estudos de degradação foi determinada de acordo com a equação 1:

$$R = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

A percentagem de produtos de degradação foi determinada pela percentagem de área em relação à área do pico principal (7-epi).

4.3.7 Cinética da Degradação de 7-epiclusianona em Peróxido de Oxigênio

A cinética da degradação de 7-epi foi monitorizada durante 18 horas utilizando o método HPLC-UV (item 4,3.3) em 2% v / v de H₂O₂. As soluções de 7-epi a uma concentração de 100 µg.mL⁻¹ foram preparadas utilizando metanol como co-solvente (1:1 v/v). A degradação do 7-epi foi determinada também na formação do seu produto de degradação oxidativo.

4.3.8 Estudos de Validação

Os estudos de validação foram realizados de acordo com as recomendações da Conferência Internacional de Harmonização de orientação (ICH) Q2B ("ICH guidelines Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products", 2003). Todas as amostras foram preparadas de uma mistura de metanol e água (8:2, v/v).

4.3.8.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada utilizando soluções e amostras padrão dos estudos de degradação forçada (condições de estresse oxidativo). Todas as soluções em concentração teórica de 100,0 µg mL⁻¹ foram injetados no sistema cromatográfico. A

pureza dos picos cromatográficos de 7-epi foi caracterizada por comparação dos dados do espectro UV (190-450 nm), com o espectro de 7-epi na solução submetida ao stress oxidativo (3% v/v de H₂O₂) durante 24 h. Os diluentes foram analisados na ausência de fármaco para avaliar possíveis interferências no tempo de retenção da 7-epi.

4.3.8.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada para demonstrar a relação de proporcionalidade entre a concentração das soluções padrão de 7-epi e a resposta do detector (área do pico). Para isso, uma solução padrão de estoque de 7-epi em metanol (1,0 mg mL⁻¹) foi preparada e diluições sucessivas foram realizadas para se obter soluções padrão em concentrações de 5,0 10,0, 50,0, 80,0, 100,0 e 120,0 µg mL⁻¹ (n = 3). O coeficiente de correlação (*r*) e a equação de calibração ($y = ax + b$) foram calculados, o corresponde ao declive *b* é o coeficiente linear (intercepto).

4.3.8.3 Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi determinado como a menor concentração que apresentou exatidão e precisão dentro do intervalo linear. LQ foi determinada por injeções sucessivas de soluções padrão com concentrações decrescentes, 5,0-0,1 ug mL⁻¹.

4.3.8.4 Precisão

A Precisão (repetitividade) foi determinada utilizando soluções padrão de 7-epi em três níveis de concentração (5,0, 50,0 e 100,0 ng mL⁻¹) com 6 amostras (n = 6). As análises foram realizadas em três dias consecutivos. A precisão intradia e interdia foi estabelecida como a dispersão das medições em torno do valor médio e expressa matematicamente pelo desvio-padrão relativo (RSD), determinado pela equação 2:

$$\text{RSD} = \frac{\text{Valor padrão}}{\text{Valor médio}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.3.8.5 Exatidão

A exatidão foi determinada usando soluções padrão de 7-epi em três níveis de concentração (5, 50 e 100 ng mL⁻¹) (triplicata). As análises foram realizadas em três dias consecutivos. A precisão intradia e a precisão interdia foram apresentados como erro relativo (RE) de acordo com a equação 3:

$$RE = \frac{\text{Concentração experimental} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.3.9 Caracterização do Produto de Degradação Oxidativo

Para caracterizar o produto de degradação oxidativo, a 7-epi na forma isolada (50,0 mg) foi dissolvida em uma solução preparada com 15% (v/v) de H₂O₂ em metanol diluído puro (25,0 mL). Após 48 h, o pó seco foi recuperado após secagem do solvente à temperatura ambiente.

As amostras foram analisadas por HPLC-UV-VIS e o produto de degradação oxidativo de 7-epi foi encontrado numa grande concentração (>85%). O pó seco foi usado nos estudos de caracterização.

Amostras do produto de degradação oxidativo foi analisada utilizando um cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado a um espectrofotômetro de massa (UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030) em modo de ionização de eletrospray negativo (ESI -). A aquisição de dados foi realizada no modo de corrente iônica total (TIC). A razão massa-carga (*m/z*) foi investigada na gama de 100-550. O ensaio foi realizado a fim de investigar a massa molar do produto de degradação. Uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) de fase reversa C₁₈ Acqua-fim capping coluna 150,0 × 4,6 (ID) com partículas de 4 μm e uma pré-coluna de Phenomenex C₁₈ Acqua 125 4,0 x 3,0 milímetros (ID) foram utilizado no sistema. A fase móvel foi uma mistura de metanol com tampão acetato de amônio pH 7 (80:20). A vazão da fase móvel era de 0,4 ml min⁻¹ e o volume de injeção foi de 1 μL. As amostras foram filtradas utilizando filtro de seringa de 0,45 μ composto de PTFE hidrofílico. O tempo de retenção do 7-epi foi de aproximadamente 45 minutos e do seu produto de

degradação oxidativo foi de 23 minutos. O tempo total de execução foi de 60 minutos.

Os espectros no UV foram obtidos utilizando HPLC-UV-DAD (190-450 nm).

A análise de infravermelho das amostras foi realizada utilizando Infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) em espectrômetro Shimadzu modelo Prestige 21 (Kyoto, Japão). Um acessório de amostragem de refletância total atenuada (ATR) (modelo GladiATR 300, Pike Technologies, EUA) foi utilizado e os espectros foram obtidos sem processamento das amostras.

Os espectros de ^1H RMN (ressonância magnética nuclear de hidrogênio), ^{13}C RMN (ressonância magnética nuclear de carbono) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram obtidos num Bruker AC-300 espectrômetro (300 MHz para ^1H RMN e 75 MHz para ^{13}C espectros) em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD). Os desvios químicos (δ) foram registados em partes por milhão (ppm) com referência a tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e as constantes de acoplamento (J) foram registadas em Hertz (Hz).

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DA 7-EPICLUSIANONA

4.4.1 Aspectos Gerais

O estudo é do tipo experimental, analítico e quantitativo e foi realizado no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF-UNIFAL-MG e no biotério de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa, a metodologia teve a supervisão da professora Vanessa Bergamin Boralli Marques e a colaboração da aluna Taila Kawano.

4.4.2 Materiais

Os materiais utilizados nos ensaios para avaliar o perfil farmacocinético da 7-epi serão apresentados a seguir.

4.4.2.1 Reagentes

Para a realização dos procedimentos do estudo, foram utilizados os seguintes reagentes: diazepam que foi gentilmente doado pela União Química® (São Paulo, Brasil). Acetonitrila (solvente orgânico de grau HPLC) foi adquirido a partir de LiChrosolv® (Darmstadt, Alemanha), bem como o metanol. Hidróxido de amônio foi comprado de Isofar® (Rio de Janeiro, Brasil) e o ácido acético foi obtido da Proquímios® (Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura foi purificada com o sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Foram preparadas soluções de reserva de padrão interno e de 7-epi em metanol. As diluições necessárias foram feitas a partir de soluções de estoque para construir uma curva padrão. Todos os padrões foram armazenados a -20°C.

4.4.2.2 Equipamentos

Para a realização dos procedimentos foram utilizados: Balança MicroAnalítica AUW 220D (Shimadzu®), agitador de tubos vórtex Gomixer (MX-S®), concentrador a vácuo CentriVap (Kansas City, EUA), Centrífuga LS-3 Plus (CELM®), microcentrífuga Centrifuge 5424 (Eppendorf®) e UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030.

4.4.3 Análise Instrumental

As condições cromatográficas bem como o preparo das soluções padrão, padrão interno utilizado e a extração líquido-líquido serão descritas a seguir.

4.4.3.1 Condições Cromatográficas Para Análise de 7-Epiclusianona e Padrão Interno (Diazepam)

A metodologia analítica para determinação da 7-epi e diazepam (padrão interno - PI) em plasma de camundongo foi validada utilizando extração líquido-líquido para preparo das amostras e separação/quantificação por UPLC-MS. Os parâmetros foram otimizados em UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030. O método bioanalítico desenvolvido e validado está descrito na Tabela 1.

Para a análise instrumental, utilizou-se sistema cromatográfico (sistema cromatográfico UPLC-MS/MS 8030, Shimadzu®). A detecção e quantificação da 7-

epi foram realizadas, por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) acoplada à espectrometria de massa, utilizando para a separação uma coluna analítica C18 (XR-ODS, Shimadzu®) e fase móvel de composição Metanol : tampão acetato de amônio (80:20, v/v). O sistema cromatográfico foi submetido a uma vazão de fase móvel a 0,3 mL/min com volume de injeção de 50,0 µL utilizando diazepam como padrão interno. O método bioanalítico de quantificação do analito foi desenvolvido e validado segundo a Resolução RDC nº 27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, publicada em 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Avaliou-se a linearidade/curva de calibração, exatidão e precisões inter e intradia, efeito matriz, efeito residual e estabilidade.

As condições cromatográficas desenvolvidas e validadas para a metodologia para quantificação da 7-epi por UPLC-MS/MS estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona e diazepam em plasma por UPLC-MS/MS.

| Parâmetros | Descrição |
|-----------------------------|---|
| Técnica bioanalítica | UPLC-MS/MS |
| Detecção | 7 – EPI: 501 > 145 501 > 417 501 > 363 Diazepam: 285 > 192 285 > 153 285 > 222 |
| Coluna analítica | XR-ODS-C ₁₈ |
| Pré-coluna | Ace C8 |
| Fase móvel | Metanol:tampão acetato de amônio (80:20, v/v) |
| Vazão da fase móvel | 0,3 mL/min |
| Volume de injeção | 50,0 µL |
| Tempo de corrida | 10,0 min |
| Equação da curva | y=a+bx |

Fonte: Da autora.

4.4.3.2 Preparo das Soluções Padrão

Foi preparada uma solução estoque de 7-epi na concentração de 100 µg/mL em metanol e a partir desta foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 10, 100, 500, 1000, 2500 e 5000 ng/mL plasma de camundongo, assim como as amostras de controles de qualidade baixo (CQB – 75,0 ng/mL), médio (CQM – 200,0 ng/mL) e alto (CQA – 750,0 ng/mL).

4.4.3.3 Padrão Interno

Como padrão interno utiliza-se, em geral, isótopo (possui o mesmo número de prótons, mas números de nêutrons diferentes) estável do fármaco a fim de que sejam minimizados possíveis efeitos de matriz do plasma. Entretanto, para o analito 7-epi não foi possível encontrar isótopos disponíveis comercialmente, optando-se por utilizar o diazepam.

Para o padrão interno (PI) diazepam, foi preparada uma solução estoque de 100,0 µg/mL em metanol e a partir desta obteve-se a solução de trabalho equivalente a 1,0 µg/mL plasma de camundongo.

4.4.3.4 Extração Líquido-Líquido de 7-Epiclusianona da Matriz Biológica

As amostras de plasma coletadas dos animais foram retiradas do freezer, descongeladas a temperatura ambiente.

Utilizando-se eppendorfs identificados, adicionou-se a cada um deles 100,0 µL plasma, 400,0 µL de acetonitrila e 25,0 µL de PI. Agitou-se em mesa agitadora por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 3.500 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi evaporado até securo em concentrador a vácuo CentriVap (Kansas City, EUA) a 37°C. Os resíduos foram ressuspensos em 100,0 µL de fase móvel (Metanol:tampão acetato de amônio 80:20, v/v) e alíquotas de 50,0 µL foram submetidos a análise cromatográfica em UPLC-MS/MS.

4.4.4 Validação do Método Bioanalítico

Os parâmetros de validação analítica foram avaliados segundo a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução RDC N.º 27, de 17

de maio de 2012 (BRASIL, 2012) contemplando os testes de linearidade e curva analítica, precisão e exatidão, testes de estabilidade, efeito residual e efeito matriz.

4.4.4.1 Definição das Concentrações das Amostras de Controle de Qualidade (CQ) em Plasma

As concentrações das amostras de controle de qualidade em plasma foram definidas da seguinte forma (BRASIL, 2012):

- a) LIQ – Limite Inferior de Quantificação (LIQ - 50,0 ng/mL);
- b) CQB – Controle de qualidade baixo (CQB - 75 ng/mL);
- c) CQM – Controle de qualidade baixo (CQA 750 ng/mL) ;
- d) CQA – Controle de qualidade alto (CQ – 200,0 ng/mL); 75 a 85% do LSQ (limite superior de quantificação): 12.000 ng/mL;

O limite inferior de quantificação foi definido considerando-se a sensibilidade, precisão, a exatidão e a ausência de efeito da matriz biológica. A resposta do pico cromatográfico do analito no LIQ deve ser identificável e reproduzível com precisão de no máximo 20% e exatidão entre 80 a 120% em relação a concentração nominal do padrão, através da análise de seis replicatas de padrões (BRASIL, 2012).

4.4.4.2 Linearidade e Curva de Calibração

Para determinação da curva de calibração foram analisadas amostras extraídas da matriz biológica, sendo duas amostras branco (matriz isenta de padrão do analito e do padrão interno) duas amostras zero (matriz isenta de padrão do analito) e de seis diferentes concentrações do padrão do analito, preparadas em quadruplicatas. Para preparo de cada amostra, adicionou-se 25,0 µL de padrão de 7-epi e 0,1 mL de plasma branco em seis concentrações distintas, essas concentrações foram definidas levando-se em consideração a sensibilidade da técnica bioanalítica e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas (50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 625,0; 1000,0 ng/mL plasma) e 25,0 µL PI na concentração de 250,0 ng/mL de plasma. Processou-se a amostra através da precipitação de proteínas com acetonitrila e o sobrenadante foi levado à secura em concentrador a vácuo e aquecimento (37°C), sendo então ressuspendidas em 100 µL de fase móvel para posterior injeção no UPLC-MS.

A linearidade do método foi testada a partir do mesmo procedimento descrito acima de 50,0 a 7.500,0 ng/mL de plasma.

4.4.4.3 Precisão e Exatidão Intra e Interdia

Segundo a ANVISA a precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea em idênticas condições de ensaio, enquanto que a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2012).

A precisão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias distintos. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). O DPR é calculado segundo a equação 4:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Média}} \quad (\text{Equação 4})$$

A exatidão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativa (EPR) conforme equação 5:

$$\text{Exatidão} (\%) = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Para avaliação dos parâmetros precisão e exatidão, foram analisadas amostras fortificadas com padrões de 7-epi (8 amostras) em concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA em plasma após passarem pelo processo de extração, não se admitindo valores superiores a 15% exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

4.4.4.4 Efeito Residual

Para análise do efeito residual foram realizadas três injeções, no UPLC-MS-MS, da mesma amostra branco sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada do limite superior de quantificação (LSQ).

As respostas dos picos interferentes, segundo a ANVISA devem ser inferiores a 20% da resposta nas amostras processadas do Limite Inferior de Quantificação (LIQ - 50,0 ng/mL).

4.4.4.5 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação de amostras branco processadas e posteriormente foram adicionados de analito e PI e soluções nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA.

Para o cálculo do coeficiente de variação (CV), obteve-se o fator de matriz normalizado (FMN), conforme a equação 6:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad (\text{Equação 6})$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMN relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

4.4.4.6 Estabilidade

A estabilidade da 7-epi e do padrão interno em matriz biológica foi demonstrada por meio dos seguintes ensaios: estabilidade ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD), estabilidade de curta duração (ECD), estabilidade pós-processamento (EPP) e estabilidade de longa duração (ELD).

A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (BRASIL, 2012).

4.4.4.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras de plasma (0,1 mL) fortificadas nas CQB e CQA em plasma (4 amostra, para cada concentração) foram congeladas por 24 horas. Após esse período, foram descongeladas em temperatura ambiente e novamente congeladas por 12 horas. O processo foi repetido por mais 12 horas de congelamento e após o descongelamento total das amostras, procedeu-se à extração e análise em UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

4.4.4.6.2 *Estabilidade de curta duração*

Amostras fortificadas com padrões (6 amostras, para cada concentração) nas concentrações de nas CQB e CQA em plasma foram deixadas em repouso nas condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) e durante o processo de preparo das amostras (3h). Em seguida, foram submetidas à extração e analisadas em UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

4.4.4.6.3 *Estabilidade das amostras processadas*

Alíquotas de plasma branco foram fortificadas com padrões (6 amostras, para cada concentração) nas CQB e CQA em plasma foram processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo. O período foi superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa. Na sequência, ocorreu a análise em UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas.

4.4.5 Ensaio com Animais

Os animais utilizados para determinação do perfil farmacocinético da 7-epi foram Camundongos da linhagem swiss, machos, não infectados e infectados com *S. mansoni*, com peso médio corporal de 20-30 g, idade aproximada de oito semanas. Os camundongos não infectados foram provenientes do Biotério Central da UNIFAL em Alfenas, MG, os camundongos infectados foram doados pelo biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG.

4.4.5.1 Manutenção do Ciclo do *S. mansoni* em Laboratório

A cepa LE de *S. mansoni* (cepa isolada do paciente Luiz Evangelista) é rotineiramente mantida por passagens em série em modelos *Biomphalaria glabrata* e camundongos da linhagem *swiss*. Esta cepa vem sendo mantida durante mais de 40 anos no Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (KATZ et al., 1973). Todos os estudos, incluindo determinação do perfil farmacocinético da 7-epi, ensaios de toxicidade da 7-epi e ensaios esquistossomicidas os quais envolveram animais, foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade de Alfenas (UNIFAL-MG, número 534/2013) e Comitê Ético em Uso de Animais, Fiocruz, Brasil (LW 21/16).

Os procedimentos envolvendo o manejo e cuidados com os animais foram realizados segundo preceitos legais estabelecidos pela “Lei Arouca”, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art.225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

4.4.5.1.1 Infecção e exame dos caramujos

Os caramujos da espécie *B. glabrata* foram mantidos em laboratório dentro de um aquário com água corrente e boa oxigenação, apresentando pH entre 7,2 a 7,8 e isenta de cloro, cobre e zinco, que dificultam a sobrevivência dos mesmos. A linhagem da espécie citada foi susceptível às cepas de *S. mansoni*, mantidas em laboratório. Para a infecção dos mesmos, os miracídios foram obtidos a partir do fígado dos camundongos infectados (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

A infecção desses moluscos, como rotina, é feita com 10 miracídios por caramujo. Os miracídios são colocados em contato com os caramujos por algumas horas sob estímulo luminoso. Após este período os caramujos foram transferidos para uma sala para serem mantidos a 28°C. Após 30 dias, os caramujos foram colocados individualmente em beakers de vidros com água e expondo-os à luz para que ocorra a eliminação de cercárias (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

4.4.5.1.2 Infecção dos camundongos

Camundongos da linhagem *swiss*, machos, com aproximadamente 8 semanas de idade, com peso médio corporal de 20-30 g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos experimentos, para avaliação da atividade das substâncias. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água em todo experimento.

As cercárias de *S. mansoni*, cepa LE, usadas para infecção dos camundongos foram fornecidas pelo moluscário do CPqRR.

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único becker, originando um “pool” de cercárias LE provenientes de caramujos. De cada becker foi retirado uma alíquota de aproximadamente 0,3 mL para serem contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas foram ajustadas a fim de se obter uma concentração equivalente a 100 ± 10 cercárias em um volume de 0,3 mL.

Os camundongos foram inoculados no dorso individualmente 100 ± 10 cercárias, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox, com agulha e com volume ajustável.

Os animais não infectados e infectados foram acondicionados, para aclimação, biotério de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UNIFAL-MG, por um período de 7 dias que antecederam ao experimento, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com umidade relativa do ar entre 50% e 70% e ciclo natural claro-escuro de 12/12 h. Receberam água filtrada e ração para roedores.

Para o estudo do perfil farmacocinética da 7-epi, os animais foram divididos em 20 grupos com 6 animais, sendo que 10 grupos eram de animais não infectados e 10 grupos com animais infectados com 45 dias de infecção. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 20 grupos com seis animais em cada grupo, de modo que 10 deles eram animais não infectados e 10 deles eram animais infectados com *S. mansoni* com 45 dias de infecção. Camundongos não infectados da mesma idade e sexo serviram como controles

No período de adaptação e de experimentação, os animais foram mantidos em gaiolas em salas com controle de temperatura a 21 a 23 °C e manutenção de ciclo diário claro/escuro de 12 h, recebendo ração água filtrada à vontade. 12 horas

antes do experimento os animais ficaram em jejum, com água a vontade. Após jejum os animais receberam por sonda gástrica uma única dose oral de 15,0 mg/kg de 7-epi dissolvidos em óleo de milho, cuja dose foi escolhida pelos fatos de que compostos com características lipossolúveis já foram padronizados com esta dosagem e a 7-epi é um composto com estas características.

Os camundongos foram anestesiados por inalação de CO₂ e o sangue total foi coletado por punção cardíaca, utilizando do heparina, 5 UI/mL, como anticoagulante, sendo colocada uma gota em cada tubo eppendorf e feita a ambientação das seringas antes da coleta. Foram retirados volumes de 1,0 mL de sangue nos zero, 5,0, 10,0, 15,0 min e 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 e 6 h após a administração da substância.

Após cada coleta, as amostras sanguíneas foram identificadas (animal e tempo da coleta) e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min para obtenção do plasma, sendo armazenadas em seguida, a -80 °C, para posterior quantificação da 7-epi em UPLC-MS/MS.

4.4.6 Parâmetros Farmacocinéticos e Análise Estatística

A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada observando-se os perfis individuais dos animais pertencentes ao grupo experimental. Foram mensurados os parâmetros farmacocinéticos meia-vida ($t_{1/2}$), clearance (Cl), área sob a curva (ASC), concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo no qual essa concentração foi atingida (t_{max}).

A C_{max} foi o único parâmetro farmacocinético obtido diretamente dos dados experimentais, sendo os demais calculados a partir dos gráficos das curvas de concentração plasmática vs tempo. A meia-vida foi obtida pela análise gráfica e determinado por modelo monocompartimental, sendo este de melhor adaptação aos dados experimentais do presente estudo. O cálculo da constante de velocidade de eliminação (K_{el}) foi realizado por meio da equação $K_{el} = 0,693/t_{1/2}$. As áreas sob as curvas de concentrações plasmáticas vs tempo foi calculada através do método dos trapezóides. Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pelo GraphPad InStat (GraphPad Software, CA, EUA) para o cálculo da média, mediana e intervalo de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 7-EPICLUSIANONA

Para se conhecer o potencial de toxicidade da 7-epi foram avaliados os parâmetros bioquímicos, o poder genotóxico/mutagênico e capacidade da 7-epi em promover apoptose.

4.5.1 Ensaio de Avaliação dos Marcadores Bioquímicos de Toxicidade

Para esses ensaios foram avaliados os teores de AST, ALT, albumina, proteína totais, creatina e glicose dos animais infectados e não infectados, tratados com 7-epi

4.5.1.1 Aspectos Gerais

O estudo foi realizado no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz e no Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa, a metodologia teve a supervisão da professora Maria Rita Rodrigues e a colaboração do aluno André Luiz Machado Viana.

4.5.1.2 Experimentação em Animais

Camundongos da linhagem swiss, machos, infectados e não infectados, com aproximadamente 8 semanas de idade, com peso médio corporal de 20-30 g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, foram utilizados nos ensaios de avaliação dos marcadores bioquímicos de toxicidade. Os camundongos infectados foram inoculados individualmente no dorso, por via subcutânea, com 100 ± 10 cercárias, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968) (conforme item 4.5.5)..

4.5.1.3 Delineamento Experimental

Os animais foram separados em grupos 2 grupos, um grupo de animais infectados (45 dias após infecção) e outro de animais não infectados, ambos os

grupos foram subdivididos em grupos de animais não tratados, grupos de animais tratados com óleo de milho, outro grupo de animais tratados com 100,0 mg/Kg de 7-epi e por fim, grupos de animais tratados com 300,0 mg/Kg de 7-epi (Tabela 2), cada grupo contendo 10 animais (n=10) que foram tratados com 7-epi via oral, por gavagem, durante 5 dias consecutivos e eutanasiados no sexto dia a partir do tratamento.

As doses de 100 e 300 mg/Kg foram escolhidas devido ao protocolo usado pelos pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, que utilizam essas doses para substância que não tem sua atividade esquistossomicida conhecida.

Tabela 2 - Delineamento experimental dos testes bioquímicos * n=10

| | | |
|----------------------------|----------|-----------------------------------|
| | Grupo 1* | Não tratados |
| | Grupo 2* | Tratados com óleo de milho |
| Camundongos não infectados | Grupo 3* | Tratados com 100,0 mg/Kg de 7-epi |
| | Grupo 4* | Tratados com 300,0 mg/Kg de 7-epi |
| | Grupo 5* | Não tratados |
| Camundongos infectados | Grupo 6* | Tratados com óleo de milho |
| com <i>S. mansoni</i> | Grupo 7* | Tratados com 100,0 mg/Kg de 7-epi |
| | Grupo 8* | Tratados com 300,0 mg/Kg de 7-epi |

Fonte: Da autora.

4.5.1.4 Obtenção do Soro

No 1º dia após o tratamento o sangue dos animais de todos os grupos foi coletado por decapitação. Esse sangue foi colocado em microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos. O soro foi separado e congelado a -20 ° C para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

4.5.1.5 Dosagem no Soro

Os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), creatinina, albumina e proteína, foram dosadas usando kits comerciais da marca Labtest®. E as condições de

realização foram as descritas pelo fabricante. As análises foram realizadas em aparelho Analisador Automático (Labmax 240®).

A metodologia aplicada e a reação utilizada em cada um dos testes podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação de analitos, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda (reagentes Labtest)

| Analito | Metodologia | λ (nm) |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| Glicose | A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra (BURTIS et al., 1986). | 505 |
| ALT | Cinética UV-IFCC: ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato que é reduzido a lactato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da ALT na amostra (BURTIS et al., 1986). | 340 |
| AST | A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido à malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada à NAD. A redução da absorbância em 340 ou 365 nm, conseqüente à oxidação da NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra (THRALL et al., 2015). | 340 |
| Albumina | A albumina tem a propriedade de se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina. A cor formada é proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração de 6,0 g/dL (PETERS et al., 1982). | 600 |
| Proteínas Totais | Biureto: íons cobre em meio alcalino reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura. A cor é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra (BURTIS CA et al., 1986). | 545 |
| Creatinina | A creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha. A quantidade da cor formada é proporcional à concentração de creatinina na amostra (THRALL et al., 2015). | 505 |

Fonte: Labtest, (www.labtest.com.br).

4.5.1.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism (versão 5.0), onde as diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey's de comparações múltiplas.

Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,005$.

4.5.2 Ensaios de Genotoxicidade Versus Antigenotoxicidade, Mutagenicidade versus Antimutagenicidade

Para esses ensaios foram feitos teste cometa, micronúcleo e apoptose dos animais infectados e não infectados, tratados com 7-epi.

4.5.2.1 Aspectos Gerais

O estudo foi realizado no Laboratório de Análise Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANTIN) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa, a metodologia teve a supervisão da professora Luciana Azevedo e a colaboração da aluna Laila Vieira.

4.5.2.2 Animais e Reagentes

Os animais usados neste estudo foram Camundongos da linhagem swiss, machos, não infectados, com aproximadamente 8 semanas de idade, com peso médio corporal de 20-30 g obtidos do biotério central da UNIFAL-MG. Foram usados também camundongos da linhagem swiss, machos, infectados com *S. mansoni* (45 dias de infecção, conforme item 4.4.5), com peso médio corporal de 20-30 com idade de aproximadamente 8 semanas, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz.

Os animais foram mantidos em caixas de policarbonato em condições ambientais controladas: temperatura de $(22 \pm 3^\circ \text{C})$; umidade relativa do ar $(55 \pm 10\%)$ e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro e água filtrada *ad libitum*.

As substâncias mutagênicas (órgão-específicas) utilizadas foram: doxorubicina (DXR) e N,N'-dimetilhidrazina (DMH), adquiridas do Sigma (EUA). As doses, as vias de exposição e órgãos-alvo desses compostos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Protocolo de utilização dos agentes químicos.

| Agentes | Doses | Vias de Exposição | Tratamento | Órgão alvo |
|----------------|--------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|
| DXR | 16,0 mg/kg | Intraperitoneal | Dose única* | Medula óssea e sangue |
| DMH | 30,0 mg/kg | Oral | Dose única* | Cólon |

Fonte: Da autora.

* Uma única dose administrada no 15º dia do experimento.

Os agentes doxirrubicina (DXR) e N,N'-dimetilhidrazina (DMH) utilizados como controle foram escolhidos por possuírem órgãos alvos nos materiais biológicos de interesse no estudo, como leucócitos do sangue e eritrócitos de medula óssea para DXR e colonócitos para DMH. Esses agentes apresentam como mecanismos de ação a indução de lesões no DNA.

4.5.2.3 Delineamento Experimental

Para escolha das doses foi feito um levantamento bibliográfica de estudos que avaliavam atividade biológica da 7-epi (MURATA et al., 2008; NALDONI et al., 2009; SANTA-CECÍLIA et al., 2011a, 2011b, 2012). Com base nestes estudos foram escolhidas para os testes genotóxicos e mutagênicos as doses de 10,0 (7-epi 1); 50,0 (7-epi 2) e 100,0 mg/Kg (7-epi 3), sendo esta diluída em óleo de milho (nas concentrações de 3mg/mL, 15mg/mL e 30 mg/mL, respectivamente) e administradas durante 14 dias via oral por gavagem.

Para os ensaios com a 7-epi os animais foram divididos em 16 grupos de tratamento (Tabela 5), sendo 12 grupos de animais não infectados e 4 de animais infectados com *S. mansoni* (45 dias de infecção), tendo 8 animais em cada. Os estudos utilizaram três grupos controle, sendo dois controles positivos (um para DMH e outro para DXR) e o outro controle negativo (NaCl 0,9%). Foram usados os mesmos animais para análise de todos os parâmetros (teste de micronúcleo de medula e de cólon, ensaio cometa e apoptose)

De acordo com cada grupo experimental, a injeção intraperitoneal (i.p.) foi de DXR (16 mg/Kg p.c.) ou solução salina. A dose de DXR foi estabelecida baseando-se na sua eficácia de indução de danos cromossômicos em roedores (ANTUNES;

TAKAHASHI, 1998). Os grupos controle negativo foram tratados de modo similar, recebendo óleo de milho por lavagem e solução salina 0,9% (NaCl 0,9%).

Tabela 5 - Delineamento experimental dos testes de citotoxicidade

| Grupo | Tratamento | Animais |
|---------------------------|---------------------------------|----------------|
| G1* (controle positivo) | DXR*** | |
| G2* (controle positivo) | DMH**** | |
| G3* (controle negativo) | NaCl 0,9 %** | |
| G4* (7-epi + DMH) | 10,0 mg / Kg 7-epi + DMH | |
| G5* (7-epi + DMH) | 50,0 mg / Kg 7-epi + DMH | |
| G6* (7-epi + DMH) | 100,0 mg / Kg 7epi + DMH | Não infectados |
| G7* (7-epi + DXR) | 10,0 mg / Kg 7-epi + DXR | |
| G8* (7-epi + DXR) | 50,0 mg / Kg 7-epi + DXR | |
| G9* (7-epi + DXR) | 100,0 mg / Kg 7-epi + DXR | |
| G10* (7-epi + NaCl 0,9 %) | 10,0 mg / Kg 7-epi + NaCl 0,9 % | |
| G11* (7-epi + NaCl 0,9 %) | 10,0 mg / Kg 7-epi + NaCl 0,9 % | |
| G12* (7-epi + NaCl 0,9 %) | 10,0 mg / Kg 7-epi + NaCl 0,9 % | |
| G13* (7-epi) | 10,0 mg / Kg 7-epi | |
| G14* (7-epi) | 10,0 mg / Kg 7-epi | Infectados |
| G15* (7-epi) | 10,0 mg / Kg 7-epi | |
| G16* (controle negativo) | NaCl 0,9 %** | |

Fonte: Da autora.

* n=8; ** NaCl 0,9% (m / v) = dose equivalente (10,0 mL/Kg p.c.) ao peso do animal***DXR = doxorubicina (16,0 mg/Kg) agente intercalante de DNA e indutor de lesões pré-neoplásicas em células da medula óssea.****DMH = N,N' – dimetilhidrazina (30,0 mg/Kg) agente alquilante e composto clastogênico.

Todos os animais foram pesados a cada dois dias para verificar o desempenho de crescimento e utilização de nutrientes dos camundongos não infectados e infectados, alimentados com dieta comercial e tratados com a 7-epi.

4.5.2.4 Ensaio de Cometa

No 14º dia de tratamento os animais receberam DXR (16,0 mg/kg) ou DMH (30,0 mg/Kg) via intraperitoneal ou NaCl 0,9% conforme os grupos experimentais. E

após 24 horas os animais foram eutanasiados com hiperdose de anestésico Ketamina/Xilasina (0,1mg/Kg e 0,05 mg/Kg, respectivamente).

O teste do cometa (Figura 8) foi realizado conforme Azevedo et al. (2003 e 2007), seguindo técnica descrita por Singh et al. (1988), com modificações introduzidas por Speit e Hartmann (1999), utilizando células de sangue periférico e fígado.

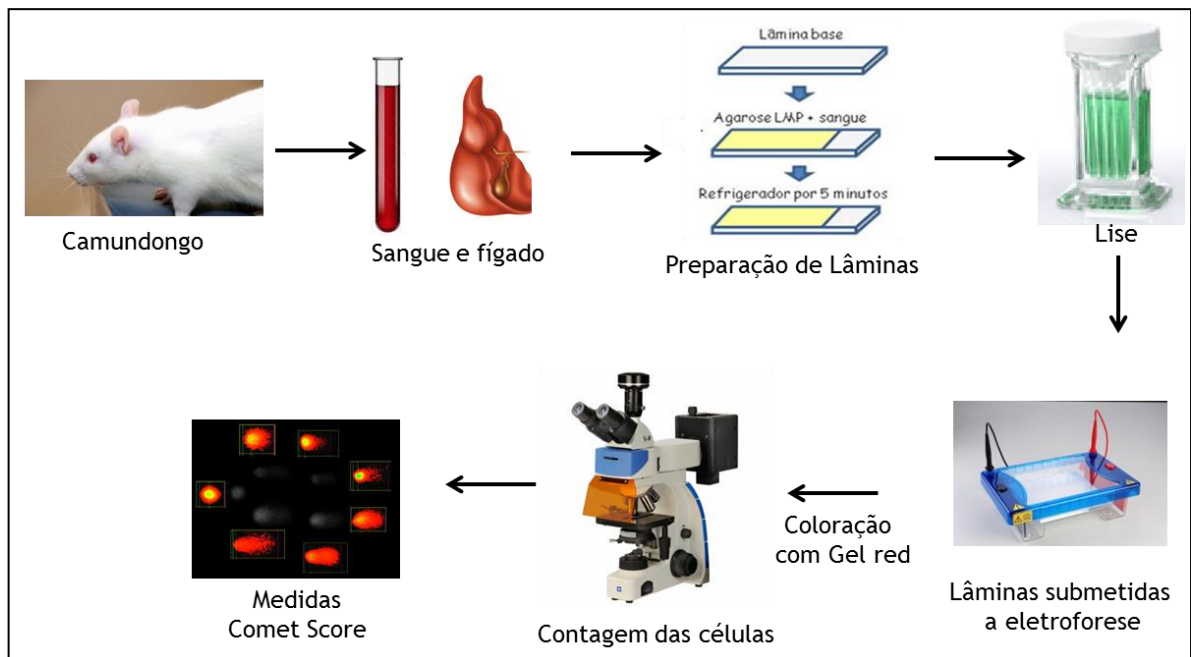


Figura 8 - Representação esquemática do teste do cometa

Fonte: Da autora.

Para estes testes foi utilizado o ensaio de cometa alcalino para avaliar a indução dos danos ao DNA da 7-epi expostas a 10,0, 50,0 e 100,0 mg/Kg.

4.5.2.4.1 Soluções para o ensaio do Cometa

Para a realização do ensaio do cometa foi necessário preparar as seguintes soluções: (a) Solução de Hanks estoque, cloreto de potássio (KCl) 0,4 g, fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) 0,06 g, Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,35 g, Cloreto de sódio (NaCl) 8,06 g, Fosfato dissódico (Na_2HPO) 0,048 g, glicose 1,0 g, EDTA dissódico 7,44 g, água Milli-Q qsp 1000 mL. (b) Solução de lise estoque com 2,5 M de NaCl, 100,0 mM de EDTA e 10,0 mM de Tris, pH 10. (c) Solução de lise preparada no momento do uso com 1% de Triton X-100, 10% DMSO e acrescido

de solução lise estoque. (d) Solução de EDTA com 3,72 g em 50,0 mL de água destilada, (e) solução de NaOH com 100,0 g em 250,0 mL de água destilada, (f) o tampão de eletroforese foi preparado no momento do uso com 10,0 mL de EDTA e 60,0 mL de NaOH em 2,0 L de água destilada a 4°C, pH 13. (g) Solução de neutralização com Tris a 0,4 M, a 4°C, pH 7,5. (h) Solução de PBS concentrado 20 vezes com 180,0 g de NaCl anidro, 27,3 g de Na₂HPO₄ anidro, 4,85 g de Na₂H₂PO₄.H₂O e água destilada, q.s.p. 1,0 L, pH entre 7,2 e 7,6. (i) Para o ensaio foram utilizadas agarose ponto de fusão normal (85° C) (Sigma) (1,2g diluído em 80 mL de PBS 1x, a 37°C) e (j) agarose de baixo ponto de fusão (32° a 45° C) ou *Low melting point LMP* (Sigma) (0,05g diluído em 10,0 mL de PBS 1 x, a 37°C) para 50 lâminas.

4.5.2.4.2 *Procedimento Experimental*

Após eutanásia por hiper dose de anestésico (0,1mg/Kg Ketamina/0,05 mg/Kg Xilasina (e o sangue e o fígado foram coletados dos camundongos infectados e não infectados tratados com 7-epi, DXR, DMH e NaCl 0,9%, 24 horas após a injeção intraperitoneal de solução salina ou DXR. O sangue foi coletado por punção cardíaca, uma porção (17,0 µL) de sangue com EDTA foi suspendida em 180,0 µL de agarose LMP.

As suspensões celulares do fígado foi preparada utilizando 0,4 g de fígado com 2000 µL de solução de Hanks gelada em uma placa de Petri e cortados em pedaços com uma tesoura, após foi filtrado e o sobrenadante foi recolhido.

a) Preparo das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal diluída a 0,5% em solução de PBS (Livre de Ca²⁺ e Mg²⁺) a temperatura de 60°C e mantidas em temperatura ambiente até completa solidificação.

Foram adicionados 80 µL da mistura de sangue com agarose nas lâminas pré-cobertas com agarose e sobrepostas com lamínula para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Da mesma forma foram feitos com as células do fígado onde 80 µL da mistura de fígado com agarose foram adicionadas as lâminas pré-cobertas com agarose

sobrepostas com lamínula para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação.

b) Lise celular

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram delicadamente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise a 4°C e mantidas por, no mínimo 1 hora abrigadas da luz.

c) Neutralização e eletroforese

Ainda ao abrigo da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com o tampão de corrida alcalino a 4°C. A eletroforese foi conduzida a 14 V e 12 mA ou 0,5 V/cm, por 60 minutos a 4°C. Após eletroforese as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e neutralizadas em etanol 100%.

d) Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com GelRed. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas de acordo com intensidade e o tamanho da cauda do cometa. Foram analisadas 100 células por lâmina, de cada animal em aumento de 200 vezes em microscópio de fluorescência, com filtro verde. A avaliação dos danos do DNA foi realizada usando o sistema de análise de imagem *Comet Score*, cujos parâmetros avaliados são comprimento e intensidade da cauda do cometa.

4.5.2.5 Teste de Micronúcleo (MN)

No 14º dia de tratamento os animais receberam DXR (16,0 mg/kg) ou DMH (30,0 mg/Kg) via intraperitoneal ou NaCl 0,9% conforme os grupos experimentais. E após 24 horas foi realizada a eutanásia dos animais.

4.5.2.5.1 *Micronúcleo de medula*

As análises de MN em medula óssea foram realizadas conforme apresentado em Azevedo et al (2010) seguindo Macgregor et al (1987). Foi analisado o total de 1000 células por animal em microscópios Nikon, com objetiva de 100 x (por imersão).

Os animais foram eutanasiados após o tratamento. A medula óssea foi retirada do fêmur que tiveram suas extremidades cortadas para expor o canal medular. A agulha de uma seringa de 1,0 mL previamente preenchida com 1,0 mL de soro fetal bovino (SFB) foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando o SFB, de modo a empurrar a medula para dentro do tubo previamente marcado com o código do animal.

O material da medula óssea foi ressuspendido em SFB e homogeneizado. A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de SFB.

Duas gotas da suspensão homogênea foram pingadas em uma lâmina, previamente identificadas com código dos animais e um esfregaço foi realizado. As lâminas foram secas a temperatura ambiente. Foram preparadas três lâminas de cada animal.

Após secas, as lâminas foram colocadas em cubas de coloração contendo corante Leishman (Eosina azul de metileno) e coradas por 3 minutos. Após esse tempo, foram transferidas para outra cuba contendo corante Leishman diluído em água destilada na proporção 1:6, onde permaneceram por 15 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas com água corrente, em seguida, com água destilada, para retirar o excesso de corante. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, por 24 horas. A quantidade da coloração foi avaliada e as lâminas foram montadas e guardadas em caixas.

As células foram contadas diferencialmente em microscópio com aumento de 100x (por imersão), os eritrócitos normocromáticos (NCE) ou maduros (células rosadas) e os eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens (células arroxeadas). Após essa contagem, foram contadas 1000 células PCE para detectar a ocorrência de MN.

Os resultados foram expressos em frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 1000 PCE por animal.

4.5.2.5.2 *Micronúcleo de cólon*

Para o teste de mutagenicidade em enterócitos foram utilizados cólons dos animais dos grupos controle negativo, dos tratados e daqueles que receberam DMH. Os cólons foram retirados e lavados com 0,9% de NaCl para remover detritos fecais, aberto longitudinalmente no sentido do ânus ao ceco e depois enrolados com pinça formando os chamados *swiss rolls* (MOOLENBEEK; RUITENBERG, 1981). Os *swiss rolls* foram fixados em formalina neutra a 10%, embebidos em parafina (Paraplast, CML, France), seccionados através do rolo (5 µm) fixados em lâmina e corados com Feulgen-fast green após hidrólise por 1 hora a 60 - 65° C em HCl 5 N. Para cada animal foram contadas 1000 células epiteliais, com auxílio de contador manual de células em microscópios Nikon, com objetiva de 100 x (por imersão), as quais foram classificadas como normais ou micronucleadas (POZHARISSKI et al., 1979; VANHAUWAERT et al., 2001).

4.5.2.6 Apoptose

Os índices de apoptose de enterócitos foram quantificados utilizando os *swissrolls* corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e levadas à microscopia. Para determinação de índices de apoptose, foi calculada a taxa de apoptose como a porcentagem de células em apoptose (células com núcleo condensado ou fragmentado, formando corpos apoptóticos) em relação ao número total de células epiteliais de cada cripta de acordo com DIAS et al., (2006).

4.5.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism (versão 5.0), onde as diferenças entre os grupos dos testes de cometa de sangue e de fígado, micronúcleo de medula óssea e de colon e apoptose foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey's de comparações múltiplas.

Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,005$.

4.6 ESTUDOS ESQUISTOSSOMICIDA

Para os estudos parasitológicos foram avaliados a carga parasitária e o oograma dos animais infectados e tratados com 7-epi.

4.6.1 Infecção dos Camundongos

Camundongos da linhagem swiss, machos, infectados com *S. mansoni* (45 dias de infecção), com peso médio corporal de 20,0-30,0g, com idade de aproximadamente 8 semanas, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, foram infectados por via subcutânea, com 100 ± 10 cercárias (conforme item 4.4.5 de *S. mansoni* (cepa LE). segundo a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

4.6.2 Delineamento Experimental

Quarenta e cinco dias após a infecção os animais foram separados em 4 grupos com 10 animais em cada grupo (Tabela 6), e foram tratados via oral durante 5 dias consecutivos.

Tabela 6 - Delineamento experimental dos testes parasitológicos* n=10

| | | |
|---|---------|---|
| Camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> | Grupo 1 | Não tratados |
| | Grupo 2 | Tratados com **óleo vegetal extraído do milho |
| | Grupo 3 | Tratados com 100,0 mg/Kg de 7-epi |
| | Grupo 4 | Tratados com 300,0 mg/Kg de 7-epi |

Fonte: Da autora.

**solvente usado para diluir a 7-epi

4.6.3 Contagem de Vermes

Cinco dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados por fratura cervical. A perfusão foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956), resumidamente: o conteúdo visceral foi exposto; fígado e mesentério separados pela ligadura da veia renal e a veia porta foi seccionada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), contendo solução salina 0,85% heparinizada, essa solução foi injetada na aorta descendente,

permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes. Adicionalmente foi realizada a perfusão do fígado através da injeção de salina 0,85%, heparinizada, no hilo hepático. Os vermes foram coletados em placas e petri, contados e separados em macho, fêmea e acasalados com auxílio de uma lupa.

A atividade da 7-epi foi avaliada considerando a média do número de vermes e as taxas de distribuição de verme no mesentério e fígado (PELLEGRINO et al., 1962).

4.6.4 Oograma

O oograma foi feito cortando um fragmento de $\pm 1,0$ cm da porção distal do intestino delgado, essa porção foi esmagada entre lâmina e lamínula de plástico e observada ao microscópio óptico para caracterização dos ovos. O oograma é considerado alterado na ausência de ovos nos estágios iniciais de desenvolvimento (PELLEGRINO et al., 1962).

4.6.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism (versão 5.0), onde as diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey's de comparações múltiplas. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,005$.

4.6.6 Análise Histopatológica dos Animais Infectados

Na análise histopatológica foram avaliados a quantidade e o tamanho dos granulomas, bem com o infiltrado inflamatório tecidual.

4.6.6.1 Análise Histomorfométrica dos Granulomas

Os fígados dos animais foram extraídos para análise dos granulomas hepáticos formados devido à resposta imune do hospedeiro contra os ovos de *S mansoni*. Amostras de fígado dos camundongos foram retirados e fixados em

formalina 10% tamponada (pH 7,2). Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica fundida a 60°C.

Posteriormente, foram incluídas em parafina e cortadas em micrótomo rotativo (Leica: modelo RM2125RT, Nussloch - Germany), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. As secções do fígado foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica. Para obter imagens dos tecidos utilizou-se microscópio AxioCam ICc3 da marca Zeiss acoplado ao programa AxioVision, Na contagem do número de granulomas, o tecido foi visualizado com a objetiva de 2,5X, 5,0X e todos os granulomas presentes nos cortes foram contados. As áreas dos granulomas foram determinadas com lentes de 10,0X por meio da ferramenta de contorno do programa de análise de imagens Image-Pro plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) para avaliar possíveis diferenças de morfologia.

As medidas das áreas foram realizadas apenas nos granulomas em que o ovo de *S. mansoni* foi claramente observado (REIS et al., 2001).

4.6.6.2 Análise do Infiltrado Inflamatório Tecidual

A intensidade do processo inflamatório no fígado foi investigada em cortes corados com hematoxilina e eosina por meio da contagem do número de neutrófilos e eosinófilos observadas nos tecidos de animais infectados em relação à celularidade observada no grupo controle. A celularidade tecidual foi avaliada em 10 campos histológicos aleatórios por animal com a utilização de lente objetiva de 40x (ampliação de 400x). A análise da inflamação foi realizada utilizando o software de análise de imagens Image-Pro® plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) (NOVAES et al., 2013).

4.6.6.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism (versão 5.0), onde as diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Barlett's e comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho serão apresentados a seguir.

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO E PORCENTAGEM DE PUREZA DA SUBSTÂNCIA

O rendimento do extrato hexânico do epicarpo de *G. brasiliensis* foi de 8,0%. A pureza (99,8%) e o tempo de retenção (18,276 min) da 7-epi foram determinados por HPLC-UV-VIS (Figura 9).

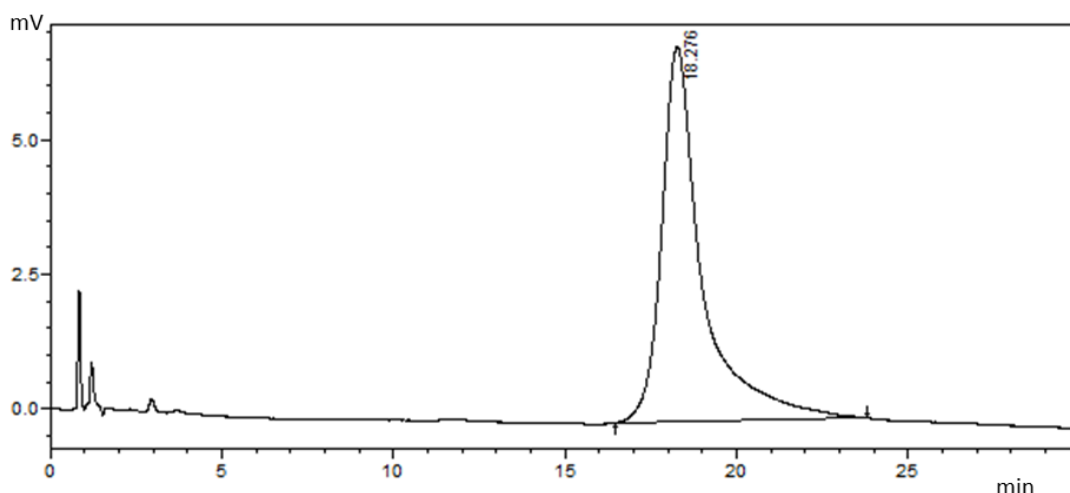


Figura 9 - Cromatograma obtido por HPLC-UV-VIS mostrando o tempo de retenção da 7-epiclusianona.

Fonte: Da autora.

Os resultados obtidos por cromatografia (HPLC-UV-VIS) mostrando a presença da 7-epi são semelhantes aos apresentados por SANTA-CECÍLIA et al. (2012) em que foi comparado o perfil cromatográfico com soluções padrão desse composto.

5.2 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DA 7-EPICLUSIANONA

O método analítico para determinação de 7-epi foi desenvolvido (triplicata) com base nas características físico-químicas desta benzofenona prenilada, como caráter ácido fraco ($pK_a = 3,71$) e lipofilicidade ($\text{Log } P = 4,90$, ChemDraw 12,0). A mistura de metanol:água (8:2, v/v) não apresentou resultados satisfatórios para análise 7-epi, levando a picos com elevado fator de assimetria ($> 2,0$). A fase móvel composta de 0,1% (g/v) de ácido fosfórico: metanol (8:2, v/v) mostrou parâmetros cromatográficos apropriados para a análise de 7-epi (Figura 10), incluindo o fator de retenção (k') de $4,8 \pm 0,5$, pratos teóricos de 3179 ± 45 e fator de assimetria de $1,270 \pm 0,040$ (Tabela 7).

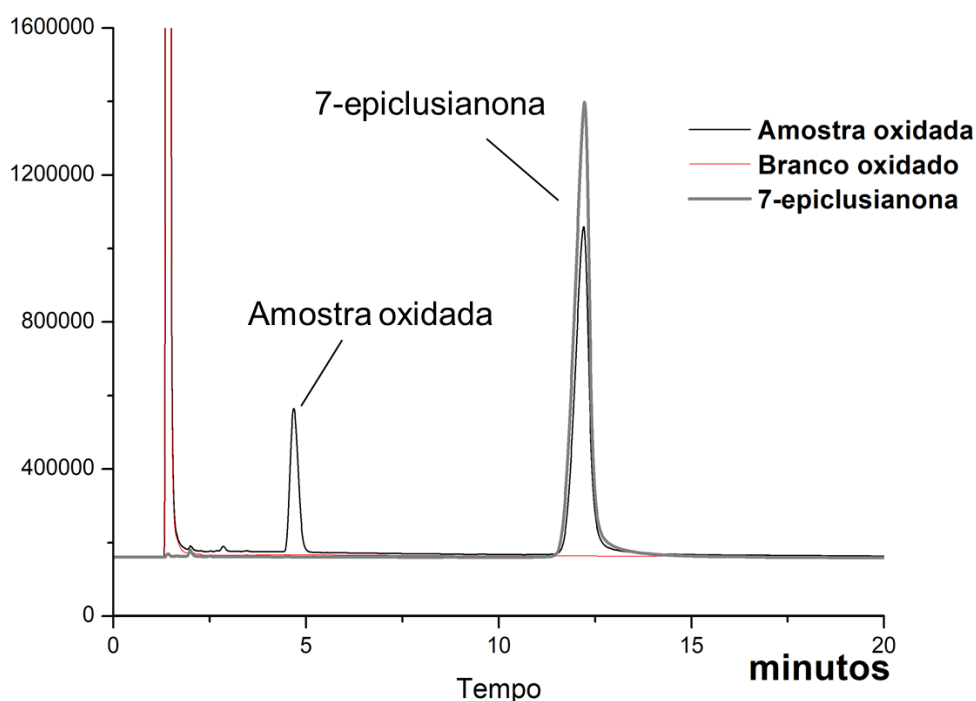


Figura 10 - Cromatogramas obtido por HPLC-UV-VIS mostrando o tempo de retenção da 7- epiclusianona e do seu produto de degradação após estresse oxidativo.

Fonte: Da autora.

A elevada lipofilicidade da 7-epi aumenta o seu K' e para obter um tempo de retenção reduzido, foi empregado uma fase móvel com grande percentagem de solvente orgânico (80%, v/v) e taxa de fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O pH ácido da fase móvel aumentou o K' de 7-epi, uma vez que o composto de ácido fraco foi mantido na sua forma protonada, aumentando a sua retenção na fase estacionária não polar.

Esta condição também permitiu alcançar um fator de assimetria reduzida (<1,3) e uma boa forma de pico.

Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos (HPLC-UV-VIS) obtidos na determinação de 7-epiclusianona

| Parâmetros cromatográficos | |
|----------------------------|---------------|
| Tempo de retenção | 10,23 minutos |
| Fator de retenção (k') | 4,8 |
| Pratos teóricos | 3179,0 |
| Fator Assimetria 10% | 1,270 |

Fonte: Da autora.

A reação química da degradação da 7-epi na condição de estresse oxidativo (0,3% v/v H₂O₂) resultando na formação de seu produto de degradação oxidativo foi melhor adaptada a um modelo cinético de primeira ordem ($r = 0,99875$). Após 14 horas não se observou uma formação apreciável do produto de degradação oxidativo, apesar da concentração de 7-epi ter continuado a diminuir gradualmente até 24 h. A degradação da 7-epi foi descrita experimentalmente como a seguinte equação de primeira ordem $y = -0.1074x + 4.5827$ (Figura 11) em que x é o tempo (h) e y é o logaritmo natural da concentração de 7-epi (expresso em % de A quantidade inicial de 7-epi).

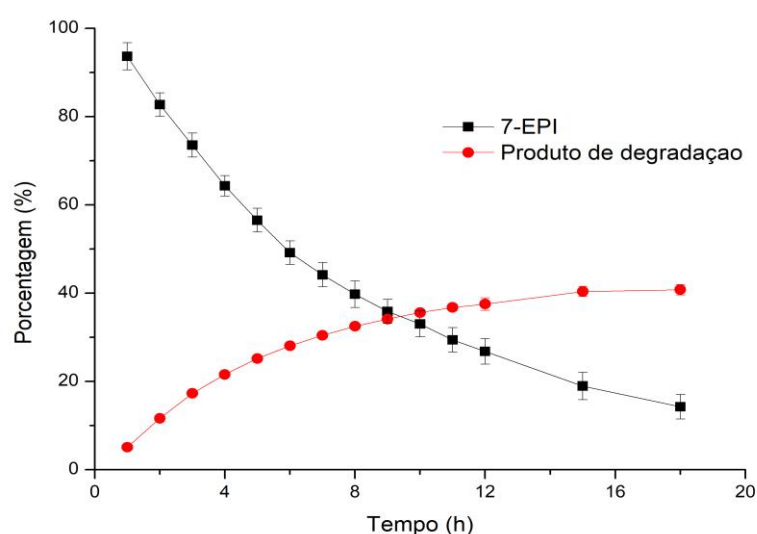


Figura 11 – Cinética de degradação da 7-epi e formação do produto de degradação oxidativo utilizando o método HPLC-UV (amostragem = 3).

Fonte: Da autora.

A pureza do pico de 7-epi na amostra submetida ao estresse oxidativo foi avaliada pelo índice de similaridade espectral usando um detector de arranjo de diodos em comparação com uma solução padrão ($r^2 > 0,999$). A análise indicou que as porções cromóforas representadas pela carbonila conjugada foram deslocadas de 207, 247 e 289 nm para 7-epi para 205, 229 e 280 nm no espectro UV do produto de degradação oxidativa. A recuperação da 7-epi nas condições de estresse forçado estão apresentadas na Tabela 8:

Tabela 8 – Porcentagem de recuperação da 7-epiclusianona após submetido as condições de stress forçado (amostragem = 3).

| Condições de Stress | Recuperação \pm DP (%) |
|--|--------------------------|
| HCl 0,1 mol L ⁻¹ - 24 h at 25°C | 95,29 \pm 1,10 |
| NaOH 0,1 mol L ⁻¹ - 24 h at 25°C | 96,59 \pm 1,59 |
| Metanol:água, 1:1 v/v (amostra diluente) - 24 h at 5°C | 95,11 \pm 1,02 |
| Tampão fosfato (pH 6,8) 20,0 mM - 8 h a 37 °C | 101,54 \pm 1,46 |
| Tampão fosfato (pH 7,4) 20,0 mM - 8 h a 37 °C | 100,56 \pm 0,36 |
| Exposição a luz - 96 h em temperature ambiente | 95,94 \pm 1,97 |
| Calor seco – 6 h at 105 °C | 98,99 \pm 0,12 |

Fonte: Da autora.

A equação de calibração e o coeficiente de correlação (r) foram $y = 12111.22184x - 2101,07279$ e 0,99993, respectivamente. Portanto, a resposta do detector à substância foi linear no intervalo de concentração de 0,5 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. LQ foi experimentalmente determinada como a concentração mais baixa do intervalo (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). LQ foi estabelecido de acordo com os resultados de exatidão e precisão, respectivamente 103,23% e 0,72%.

Os resultados para exatidão e precisão do método de análise foram considerados satisfatórios e estão apresentados na Tabela 9. Para estes estudos, os critérios adotados foram um DPR menor que 5,0% de acordo com ICH, demonstrando que os resultados estão em conformidade com as especificações.

Tabela 9 - Precisão e recuperação do método analítico.

| Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Precisão (DPR, n=3) | | Recuperação (% , n=3) | |
|---|---------------------|----------|-----------------------|----------|
| | Intradia | Interdia | Intradia | Interdia |
| 5,0 | 1,63 | 3,10 | 99,18 | 97,33 |
| 50,0 | 0,59 | 0,96 | 99,25 | 99,11 |
| 100,0 | 0,85 | 0,84 | 100,66 | 100,90 |

Fonte: Da autora.
DPR, desvio padrão relativo.

Os ensaios de estabilidade da 7-epi também foram realizados nos extratos do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis* (extrato hexânico, acetato de etila e etanólico) e uma adequada separação do composto foi observada, em que nos extratos foi possível observar somente a presença do pico da 7-epi com tempo de retenção de 12 minutos. Quando estes extratos foram submetidos ao estresse oxidativo, foi possível observar um novo pico próximo de 5 min e também uma diminuição na área do pico da 7-epi (12 min) indicando a degradação da 7-epi com formação de um novo produto com uma característica mais polar, ao qual foi denominado de amostra oxidada (Figura 12).

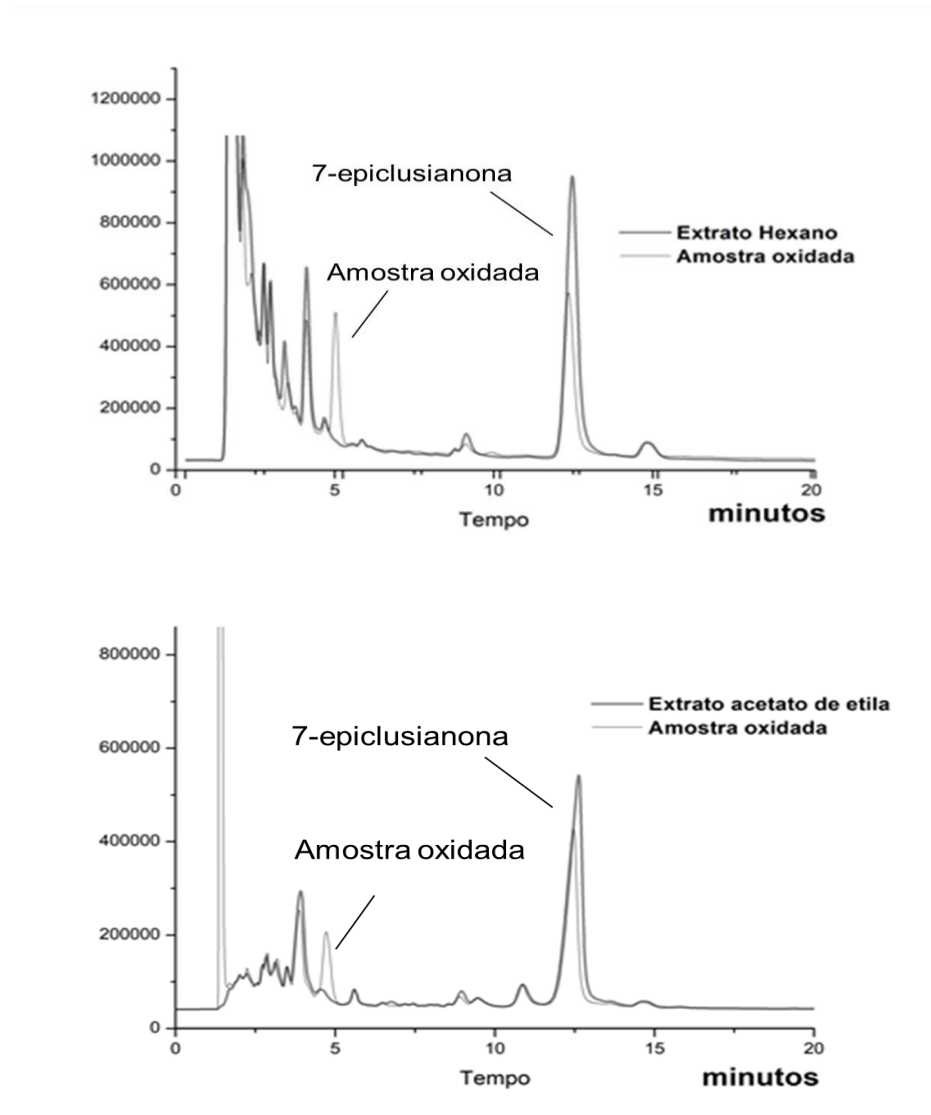


Figura 12 - Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-VIS, apresentando o pico da 7-epiclusianona e do produto de degradação nos extratos após o estresse oxidativo.

Fonte: Da autora.

Também foi possível observar que o extrato hexânico apresentou uma maior quantidade de 7-epi em comparação com os demais, sendo isto relacionado à lipofilicidade elevada do composto, aumentando sua partição no solvente não polar. Da mesma maneira, solventes com polaridade crescente como acetato de etila e etanol mostraram uma recuperação menor 7-epi (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise quantitativa da 7-epi antes e após estresse oxidativo nos extratos etanólico, hexânico e acetate de etila (amostragem = 3).

| Solvente extrator | Ensaio antes do stress oxidativo stress \pm DP (mg g ⁻¹) | Recuperação após stress oxidativo \pm DP (%) |
|-------------------|--|--|
| Etanol | 6,58 \pm 0,91 | 69,09 \pm 1,94 |
| Acetato de etila | 33,07 \pm 0,36 | 63,45 \pm 2,43 |
| Hexano | 156,37 \pm 0,47 | 69,59 \pm 1,26 |

Fonte: Da autora.
DP = desvio padrão.

A solubilidade da 7-epi em água foi determinada pelo método de agitação em equilíbrio ($3,39 \pm 0,61 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados indicam que a 7-epi é um composto pouco solúvel em água, demonstrando que este método de análise pode ser uma ferramenta auxiliar em estudos de pré-formulação para caracterizar as propriedades físico-químicas da benzofenona prenilada. A elucidação do produto de degradação oxidativo foi realizada primeiramente por LC-MS/MS onde foi possível determinar a massa do íon molecular, bem como o padrão de fragmentação. Os resultados obtidos utilizando ESI (eletrospray negativo) indicaram massa de íons moleculares de 501,3 e 517,3 m / z, respectivamente, para 7-epi e seu produto de degradação oxidativa. Para ESI +, os resultados indicaram 503,3 e 519,3 m / z, respectivamente, para 7-epi e seu produto de degradação oxidativa. Estes resultados indicaram a introdução de um átomo de oxigênio na estrutura 7-epi. O padrão de fragmentação de 7-epi usando ESI - indicou o íon em grande abundância a 417,2 m / z seguido de 363,2, 295,1, 347,1, 432,2 e 279,1 m / z. Para o produto de degradação oxidativa, o padrão de fragmentação usando ESI - indicou o íon em grande abundância em 343,2 m / z, seguido de 433,2, 379,2, 448,2, 325,1, 259,1, 219,1 e 121,0 m / z. O fragmento 121 m / z foi associado à fragmentação da unidade éster, que é

característica da benzofenona prenilada inovadora descrita em nosso estudo e não observada na estrutura 7-epi (Figura 13).

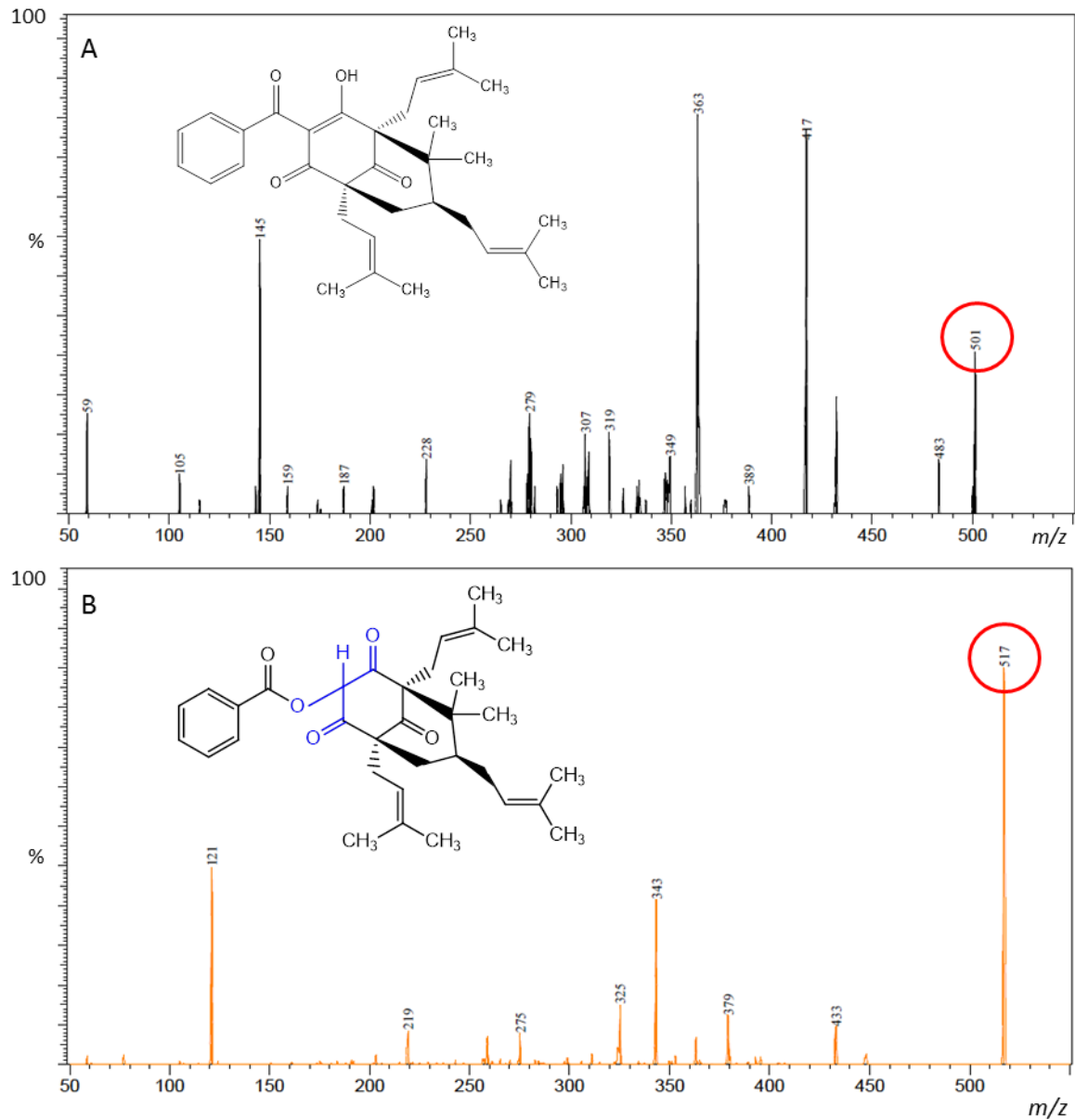


Figura 13 - Padrão de fragmentação da A) 7-epiclusionona (501,3 m / z) e B) seu produto de degradação oxidativa (517,3 m / z) analisado por LC-MS / MS usando ESI -.
Fonte: Da autora.

As análises feitas no ultravioleta demonstram que parte do espectro foi mantido. Todavia o cromóforo das carbonilas conjugadas foi alterado conforme mostra a Figura 14.

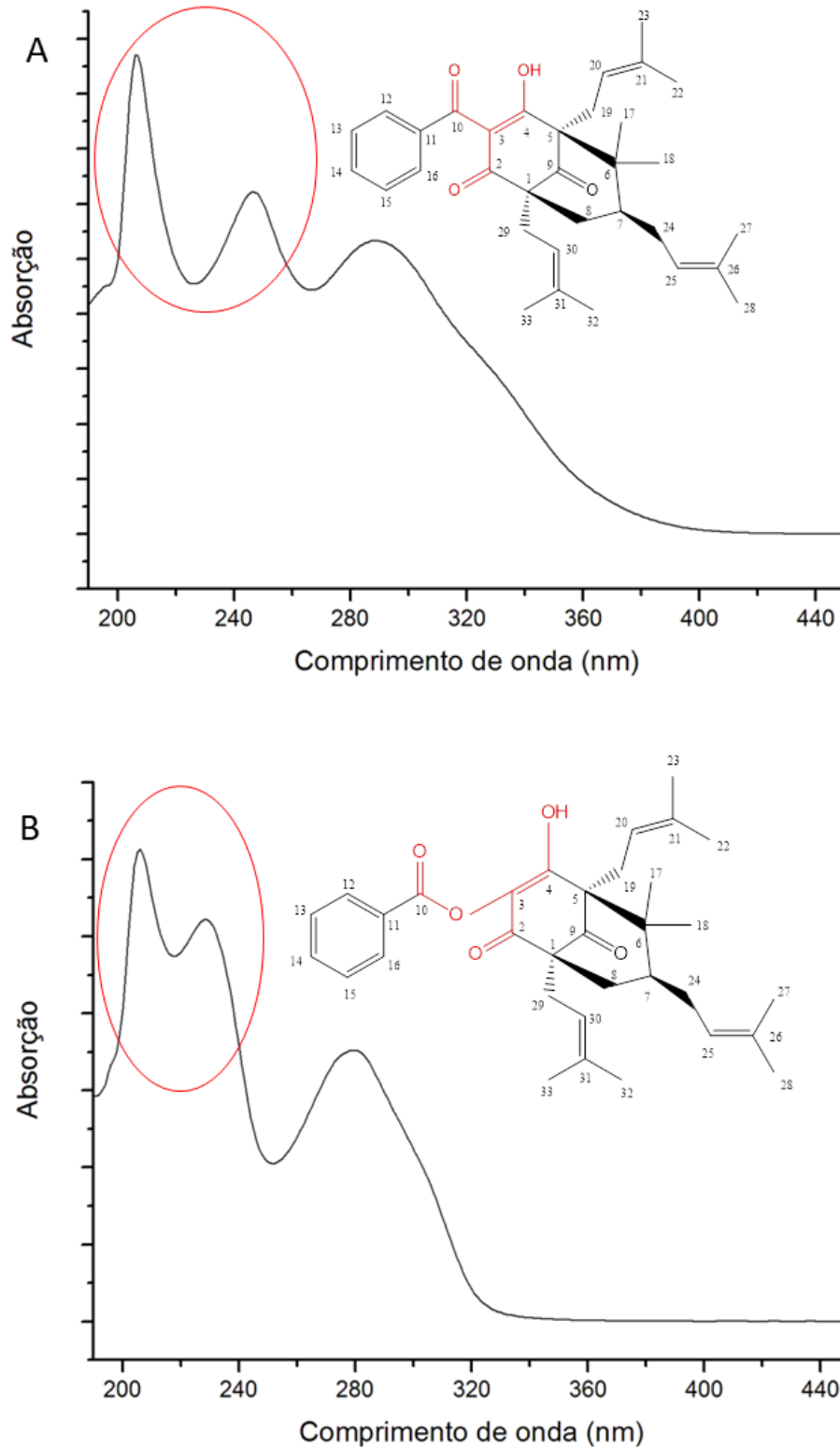


Figura 14 - Curvas de absorção no UV mostrando (A) 7-epiclusianona e (B) o produto de degradação oxidativo da 7-epiclusianona.

Fonte: Da autora.

Os espectros de absorção na região do IV (Figura 15) evidenciaram bandas de estiramento C=O de éster (1732 cm^{-1}) que são típicas de $1750\text{ a }1730\text{ cm}^{-1}$. Antes

do processo oxidativo havia apenas até 1726 cm^{-1} que era da carbonila isolada. As carbonilas conjugadas continuaram sendo observadas, porém em menor proporção. Apareceram estiramento O-H de grupos hidroxilas não queladas em bandas largas em 3300 cm^{-1} .

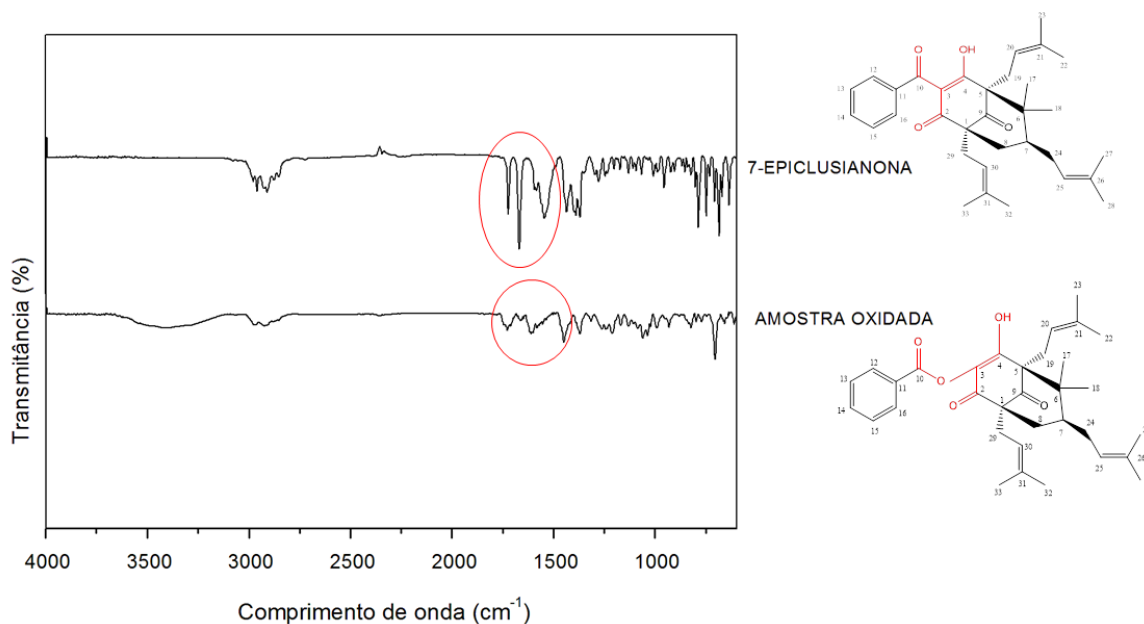


Figura 15 - Espectros no infravermelho mostrando a 7-epiclusianona e seu produto de degradação oxidativo.

Fonte: Da autora.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 16) indicaram o mesmo padrão de substituição no anel para 7-epi e seu produto de degradação, contendo 5 hidrogênios adjacentes agrupados em 2H (dupletos, ou seja, vizinhos de 1H), 2H (tripletos, vizinhos de 2H) e 1H (tripletos, vizinho de outros 2H). Estes resultados indicam que a introdução do oxigênio não ocorreu no anel benzeno.

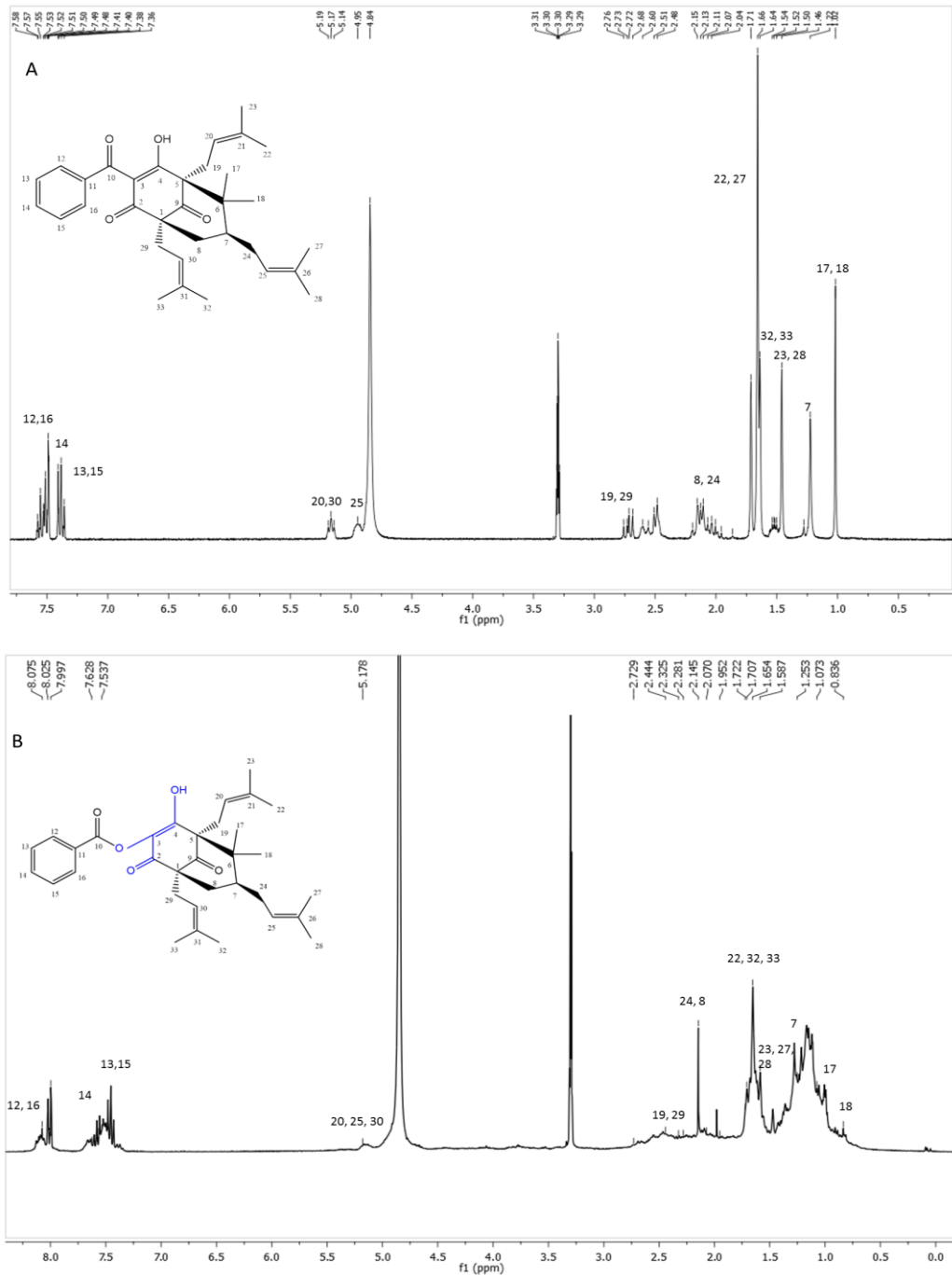


Figura 16 - Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz (A) 7-epiclusianona (CD₃OD), (B) 7-epiclusianona oxidada (CD₃OD)

Fonte: Da autora.

Os espectros de RMN de ¹³C indicaram uma nova carbonila de éster em 170 ppm (Figura 17), mostrando correlação com os hidrogênios do anel aromático (duplete) a três ligações (³J), isto visto pelo mapa de contorno no espectro de HMBC (Figura 18).

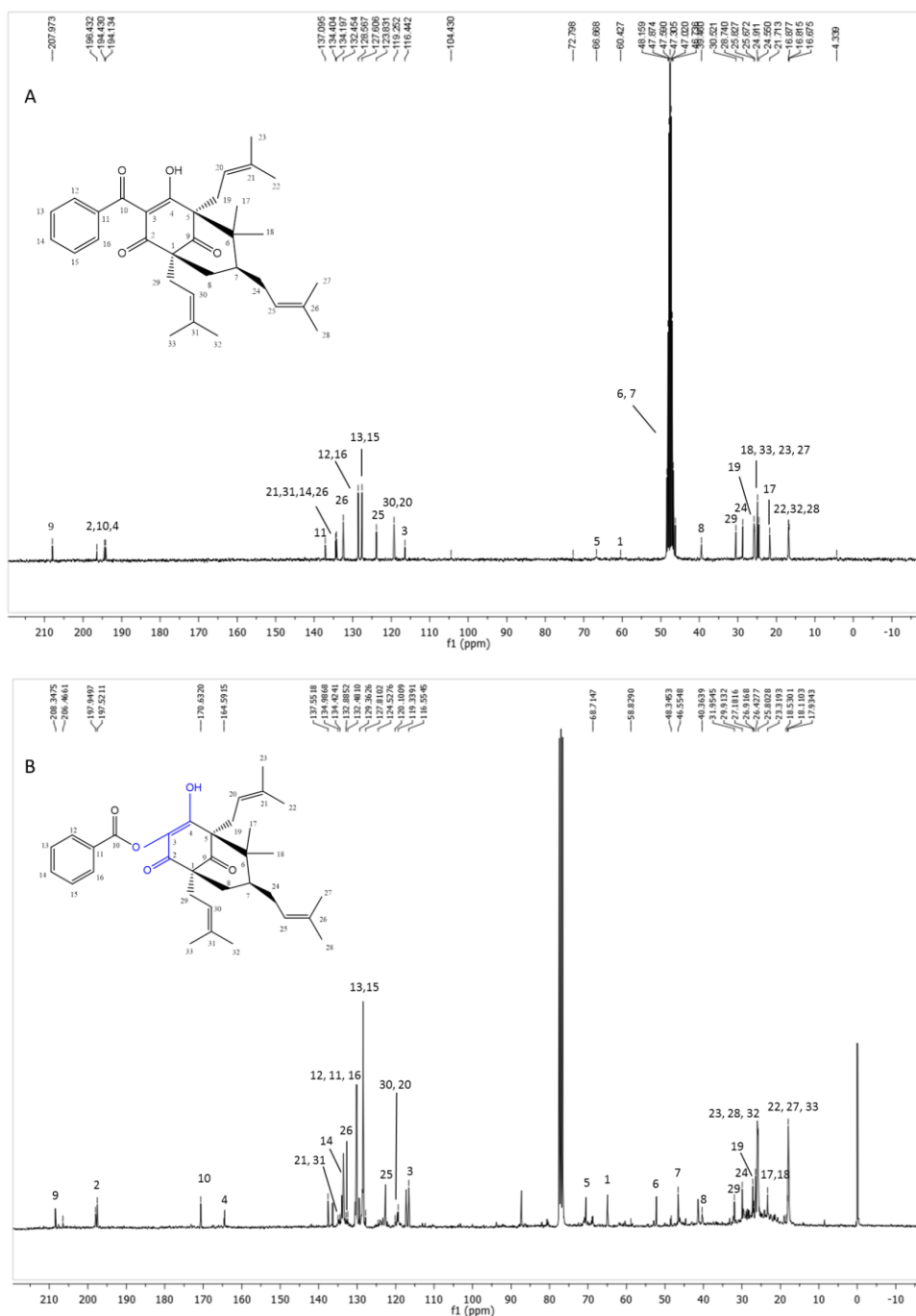


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz (A) 7-epiclusianona (CDCl_3), (B) 7-epiclusianona oxidada (CDCl_3).

Fonte: Da autora.

A comparação dos dados de RMN ^{13}C e de RMN ^1H da 7-epi e da 7-epi oxidada sugere o deslocamento químico no C10 que antes era visualizado em 194,43 ppm após o estresse oxidativo foi observado em 170,63 ppm. Assim a comparação destes dados (Tabela 11) sugere a presença de uma nova carbonila de

éster, ou seja, a adição de um átomo de O na molécula, o que é confirmado por estudos de LC-MS/MS.

Tabela 11 – Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (δ_C) e de hidrogênio (δ_H) da 7-epiclusianona e da 7-epiclusianona oxidada, obtidos do espectro de RMN¹³C e RMN¹H registrados a 300 MHz

| | | 7-Epiclusianona | | 7-Epiclusianona oxidada | |
|-----------------|-------|-----------------|------------|-------------------------|------------|
| | | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H |
| C | 1 | 60,42 | - | 58,82 | - |
| | 2 | 196,43 | - | 197,94 | - |
| | 3 | 116,42 | - | 116,55 | - |
| | 4 | 194,13 | - | 164,59 | - |
| | 5 | 66,66 | - | 68,7 | - |
| | 6 | 48,18 | - | 48,34 | - |
| | 7 | 46,73 | - | 46,55 | - |
| | 9 | 207,97 | - | 208,3 | - |
| | 10 | 194,43 | - | 170,63 | - |
| | 11 | 137,05 | - | 130,21 | - |
| | 21 | 134,40 | - | 133,98 | - |
| | 26 | 132,45 | - | 132,48 | - |
| | 31 | 134,19 | - | 133,98 | - |
| CH | 7 | 48,18 | 1,22 | 46,55 | 1.25 |
| | 12,16 | 128,56 | 7,57 | 130,21 | 8.075 |
| | 13,15 | 127,60 | 7,35 | 128,42 | 7.53 |
| | 14 | 132,45 | 7,52 | 134,42 | 7.62 |
| | 20 | 119,25 | 5,18 | 119,33 | 5.17 |
| | 25 | 123,83 | 4,94 | 122,63 | 5.17 |
| | 30 | 119,25 | 5,16 | 119,33 | 5.17 |
| CH ₂ | 8 | 39,46 | 2,12 | 40,36 | 2.14 |
| | 19 | 25,82 | 2,76 | 27,18 | 2.72 |
| | 24 | 28,74 | 2,15 | 29,91 | 2.14 |
| | 29 | 30,52 | 2,68 | 31,95 | 2.44 |
| CH ₃ | 17 | 21,71 | 1,01 | 23,31 | 1 |
| | 18 | 25,82 | 1,01 | 23,31 | 0.84 |
| | 22 | 16,87 | 1,65 | 17,93 | 1.65 |
| | 27 | 24,56 | 1,63 | 17,93 | 1.58 |
| | 28 | 16,67 | 1,50 | 26,91 | 1.47 |
| | 32 | 16,81 | 1,71 | 26,91 | 1.65 |
| | 33 | 25,67 | 1,71 | 17,93 | 1.65 |

Fonte: Da autora.

Uma vez que HMBC (Figura 18) correlaciona cada carbono aos hidrogênio próximos, permitindo mapear quais hidrogênios estão na vizinhança de cada carbono. Desta forma, pode-se observar a correlação do carbono em 170 ppm da carbonila de éster com os hidrogênios do anel aromático (8,1 e 7,5 ppm) *orto* e *meta* em relação a ela (3J e 4J).

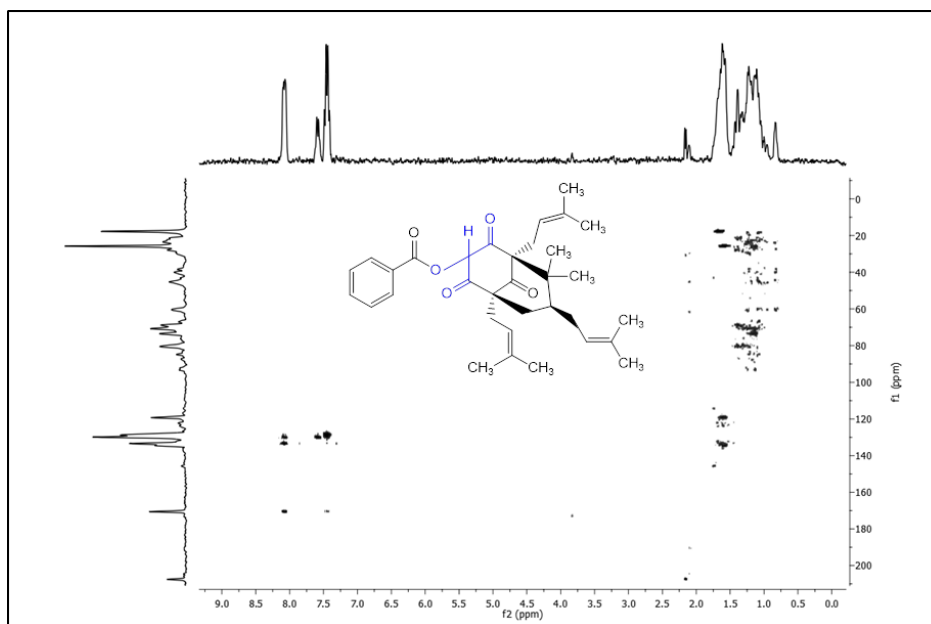


Figura 18 - Espectro de gHMBC a 300 MHz para 7-epiclusianona oxidada (CDCl_3).
Fonte: Da autora.

Resultado semelhante foi encontrado por WANG et al. (2016) em que reações envolvendo tricetonas com compostos oxidantes resultam em uma reação envolvendo a benzofenona natural Oblongifolin C (Figura 19) com peróxido (ácido paracético) e que resultou na incorporação do oxigênio pela transformação do sistema b, b'-tricarbonílico em um composto com grupamento éster, corroborando com nossas observações. Isto ocorre devido ao fato das estruturas estarem em equilíbrio cetoenólico.

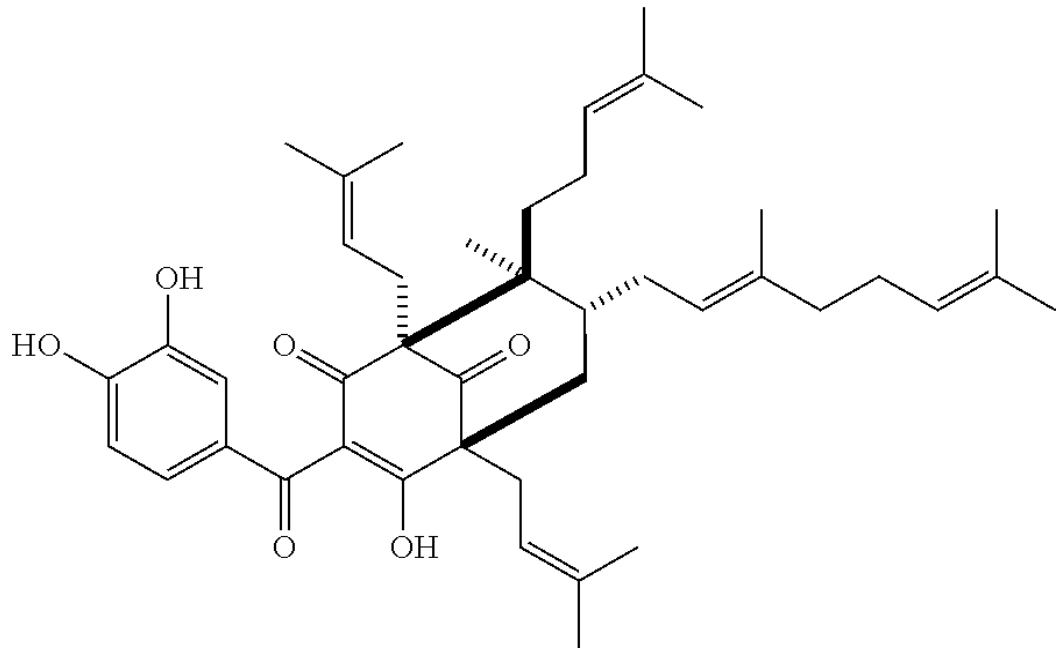


Figura 19 – Estrutura química do Oblongifolin C.
Fonte: WANG et al. (2016).

Neste caso, uma reação radicalar com peróxido (H_2O_2) faz com que um radical naquela posição seja estabilizado com as carbonilas, para justificar a presença de grupos OH, vistos no infravermelho, são frutos de estruturas em equilíbrio cetoenólico da estrutura proposta que pode conter somente carbonilas ou carbonilas com hidroxilas (Figura 20), além da mudança no espectro de absorção no UV-Vis.

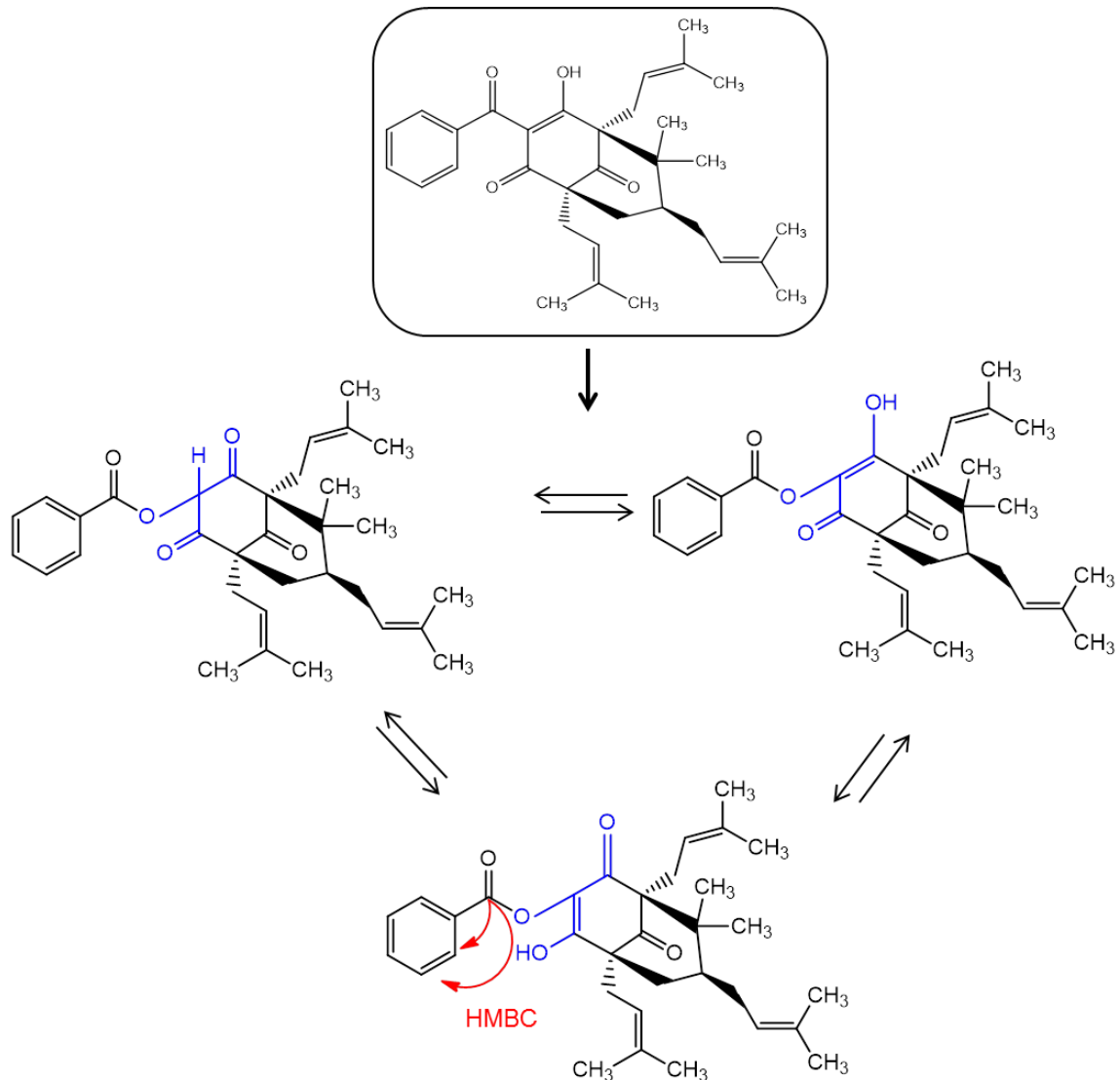


Figura 20 - Reação de radicais livres induz o estabelecimento de um equilíbrio cetoenólico de 7-epiclusianona, resultando na formação de seu produto de degradação oxidativa.
Fonte: Da autora.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DA 7-EPICLUSIANONA

Para esses testes o sangue foi coletado e centrifugado para obtenção do plasma, os quais foram congelados a -80°C até o momento das análises. E foram utilizados para o desenvolvimento e validação de metodologia analítica e para determinação de 7-epi em plasma por UPLC-MS/MS e a caracterização do perfil farmacocinético.

5.3.1 Desenvolvimento e Validação do Método Bioanalítico Para Quantificação De 7-Epiclusianona em Plasma de Camundongo

O método desenvolvido atende todos os parâmetros de aceitação da RDC 27/2012, apresentou-se linear, preciso e exato, sendo adequado para a quantificação do analito de interesse em plasma de camundongo. Os cromatogramas apresentados na Figura 21 mostram os picos obtidos para as substâncias analisadas. Cada cromatograma representa um canal (relação m/z) da análise.

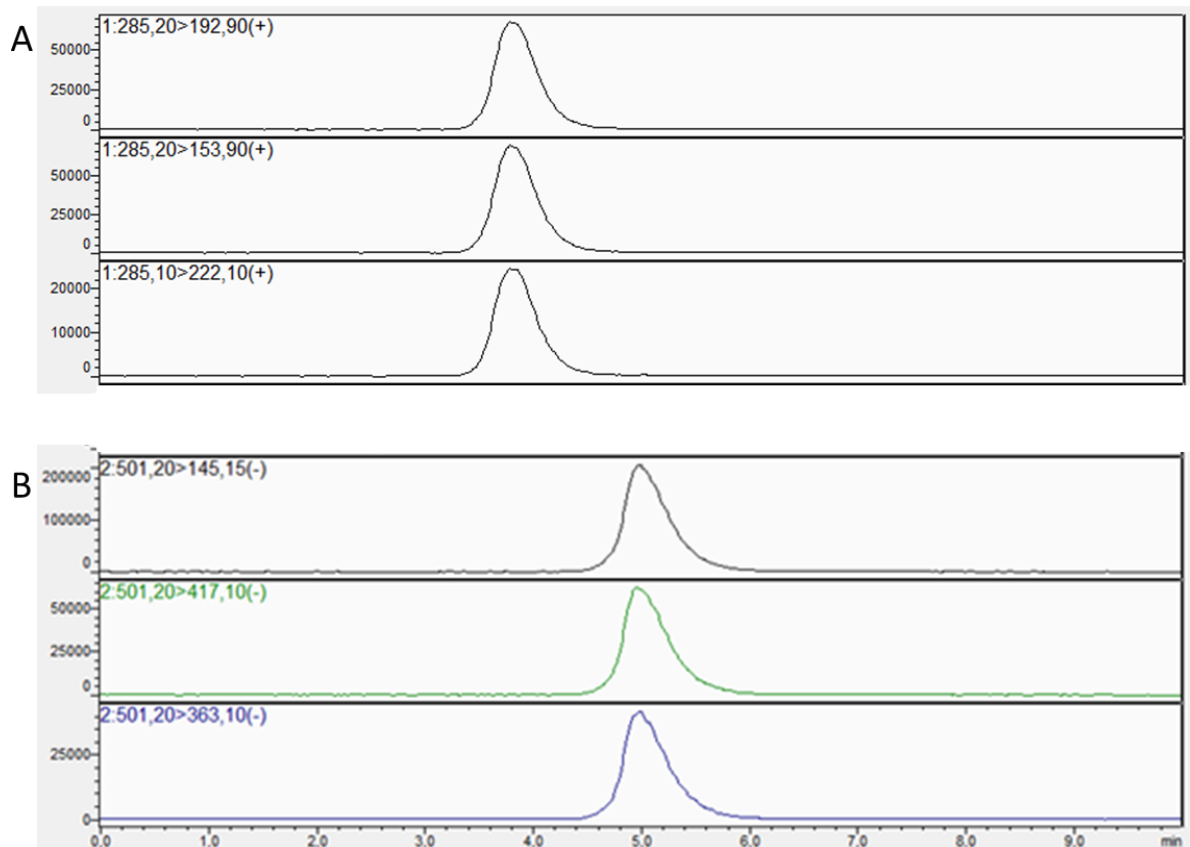


Figura 21 - Análise cromatográfica da por UPLC-MS/MS: (A) diazepam (PI) e (B) 7- epiclusianona.

Fonte: Da autora.

5.3.1.1 Linearidade

A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica contendo seis concentrações distintas. O método mostrou-se linear na faixa

de concentração de 50,0 a 7500,0 ng/mL de plasma com coeficiente de correlação linear (R^2) maior que 0,98, como pode ser observado pela Figura 22:

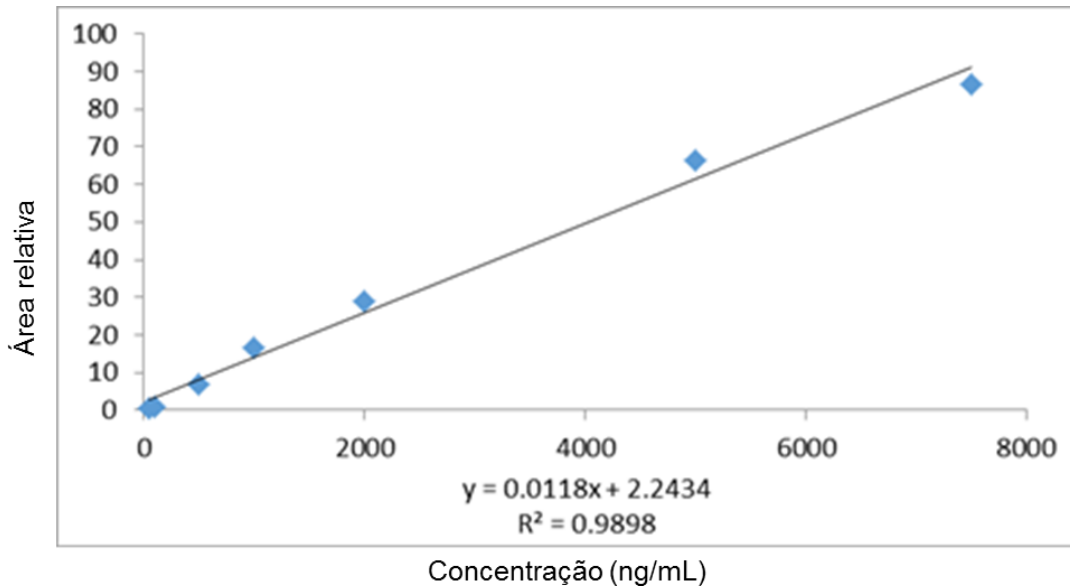


Figura 22 – Curva analítica da 7-epiclusianona em plasma de camundongo
Fonte: Da autora.

5.3.1.2 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão intracorridas e intercorridas está demonstrada na Tabela 12 abaixo, de forma que, os valores obtidos são inferiores a 15%, demonstrando que o método pode ser considerado preciso e exato.

Tabela 12 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS.

| | | (continua) | | | | |
|--------------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | | LIQ (50 ng/mL) | CQB (75ng/mL) | CQM (200ng/mL) | CQA (750ng/mL) | |
| 7 - EPICLUSIANONA | Intracorrida n=6 | Precisão (DPR%) | 4,93 | 6,28 | 7,04 | 2,27 |
| | | Exatidão (EPR%) | 8,54 | -3,22 | -7,28 | -14,04 |
| | Intercorrida n=3 | Precisão (DPR%) | 12,36 | 8,13 | 7,97 | 7,44 |

Tabela 12 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS.

| | | (conclusão) | | | |
|------------------|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | LIQ (50 ng/mL) | CQB (75ng/mL) | CQM (200ng/mL) | CQA (750ng/mL) |
| Intercorrida n=3 | Exatidão | 12,36 | 8,13 | 7,97 | 7,44 |
| | (EPR%) | -1,87 | -8,39 | -9,39 | -12,49 |

Fonte: Da autora.

5.3.1.3 Efeito Residual

Em relação ao efeito residual, não foram observados picos interferentes após a injeção das amostras branco depois do LSQ.

Os resultados observados em relação ao efeito matriz demonstraram coeficientes de variação (CV) dos FMN relativos a todas as amostras inferiores a 15%, como demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Efeito matriz referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS

| | | CQB (75 ng/mL) | CQA (750 ng/mL) |
|-------------------|---------------|-------------------|--------------------|
| 7 - EPICLUSIANONA | FMN CV (%) | 4,75 | 7,11 |

Fonte: Da autora.

5.3.1.4 Estabilidade

A determinação da estabilidade é um estudo importante para demonstrar que não ocorrem degradações químicas da molécula durante os ensaios *in vitro*. Pode-se considerar que de acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, a 7-Epi permaneceu estável, pois os desvios CQB e CQA estão dentro dos valores aceitos pela ANVISA.

Tabela 14 - Testes de estabilidade referente ao método bioanalítico desenvolvido para quantificação de 7-epiclusianona em plasma por UPLC-MS/MS

| | | CQB (75 ng/mL) | CQA (750 ng/mL) | |
|-------------------|--|--------------------|--------------------|--------|
| 7 - EPICLUSIANONA | Ciclo de congelamento e descongelamento | Precisão (DPR%) | 6,61 | 8,86 |
| | | Exatidão (EPR%) | -8,23 | -11,09 |
| | Curta duração | Precisão (DPR%) | 13,43 | 12,88 |
| | | Exatidão (EPR%) | -3,74 | -10,17 |
| | Pós - processamento | Precisão (DPR%) | 2,06 | 5,11 |
| | | Exatidão (EPR%) | 9,28 | 13,95 |

Fonte: Da autora.

5.3.2 Farmacocinética da 7-Epiclusianona em Camundongos não Infectados e Infectados com *S. mansoni*

O método desenvolvido para quantificação da 7-epi foi aplicado às amostras de animais não infectados e infectados com *S. mansoni* tratados com 7-epi. Os valores obtidos estão apresentados na Figura 23 e na Tabela 15.

Em estudo anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a 7-epi apresentou uma ação importante contra vermes adultos, cercárias e esquistossômulos de *S. mansoni*, *in vitro* (CASTRO et al., 2015). A toxicidade da 7-epi também foi avaliada e não foi observada toxicidade significativa em células de mamíferos (PEREIRA et al., 2010). O presente estudo mostrou pela primeira vez a administração de 7-epi em camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, comparando dados com um grupo controle. Após cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (MS/MS), os perfis farmacocinéticos para o grupo controle e infectados foram construídos usando escala de logarítmica (Figura 23). E foi observado uma maior absorção da 7-epi nos camundongos não infectados em relação aos camundongos infectados.

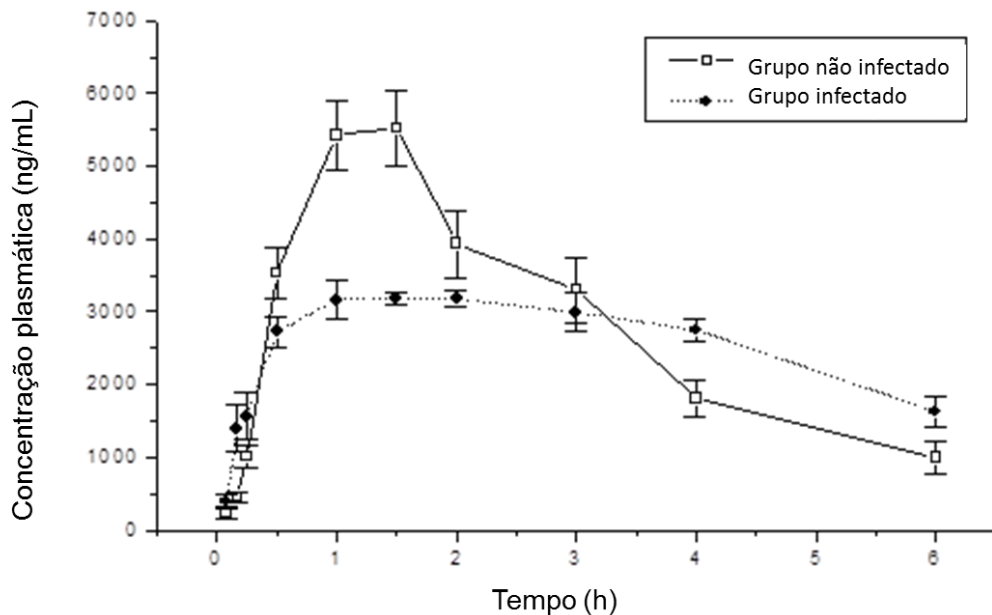


Figura 23 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para a 7-epiclusianona após administração de dose oral única de 15 mg/kg a camundongos *Swiss* (n = 6 por tempo de amostragem)

Fonte: Da autora.

Os dados obtidos, como mostra na Tabela 15, mostraram que nos camundongos infectados *S. mansoni*, houve um aumento da área sob a curva (AUC- ∞) (20846 vs 32438 ng.h/mL) e uma diminuição da depuração total aparente (0,006 vs 0,004 L/h/kg) da 7-epi em comparação com o grupo não infectado. O acúmulo de 7-epi no plasma pode ser explicada pela redução do clearance. Por conseguinte, o aumento da meia-vida (1,73 vs 6,11h) e a Cmax foi reduzida (5427,5 vs 3321,0 ng/mL), também em comparação com os animais do grupo não infectado. O tmax (tempo no qual essa concentração foi atingida) não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de 7-epiclusianona (15 mg/kg) em camundongos infectados e camundongos não infectados. Mediana, IC 95% e valor de p (n = 6).

(continua)

| Parâmetros | Não infectados | Infectados | p value |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| AUC (h.ng/mL) | 20846* (13542 - 27122) | 32438 (25534 - 40579) | 0,001 |
| Cl _r /f (L/h/Kg) | 0,0006 * | 0,0004 | 0,015 |

Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de 7-epiclusianona (15 mg/kg) em camundongos infectados e camundongos não infectados. Mediana, IC 95% e valor de p (n = 6).

| Parâmetros | (conclusão) | | |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|---------|
| | Não infectados | Infectados | p value |
| | (0,005 – 0,001) | (0,0003 – 0,0005) | |
| $t^{1/2}$ (h) | 1,73* (1,00 – 2,30) | 6,11 (4,70 – 7,54) | 0,001 |
| tmax (h) | 1,12 (0,81 - 1.38) | 1,01 (0,64 – 1,55) | 0,937 |
| Cmax (ng/mL) | 5427,5 * (4439,6 - 6342,4) | 3321 (2922,9 – 3741,1) | 0,002 |

Fonte: Da autora.

* Mann-Whitney test, $p < 0,05$.

AUC = área sob a curva, Cl= clearance, $t^{1/2}$ = tempo de meia vida, Cmax = concentração plasmática máxima.

O fígado dos camundongos infectados com *S. mansoni* apresentou grande de número granulomas proveniente dos ovos desse parasito. O granuloma é constituído de um ovo rodeado por um grande número de células inflamatórias e células fibrocísticas leucocitárias (TOUSSON et al., 2013). TOUSSON et al., 2013 observaram que as principais lesões histopatológicas da esquistossomose são devido a alguns fatores como granuloma, infiltração difusa de células inflamatórias, eosinófilos e células mononucleares, além de fibrose. Da mesma forma, EL-BANHAWAY et al. (2007) declararam que a esquistossomose provoca alterações necróticas nos tecidos do fígado.

Segundo DE LA TORRE-ESCUADERO et al., (2015), a redução na depuração e na meia-vida prolongada no grupo dos animais infectado, pode ser associada ao mecanismo patológico de lesão no fígado. Estes dados podem ser explicados pelo fato de que quando os camundongos são infectados com *S. mansoni* ocorre uma mudança na expressão de isoenzimas CYP (citocromo P450) e também a atividade das enzimas que metabolizam a substância na fase I podendo provocar as alterações nas atividades do fígado. Consequentemente podem-se alterar as ações terapêuticas dos medicamentos que são metabolizados principalmente pelo sistema P450, quando administrada a pacientes com esquistossomose. Em camundongos com esquistossomose em fase crônica, ocorre a regulação negativa da atividade de

CYP. Neste momento, os vermes estão maduros, os granulomas hepáticos estão com o tamanho máximo e a reação imunológica aos ovos do parasita está instalada.

Portanto foi possível observar que a 7-epi foi absorvida após administração oral em camundongos e a sua eliminação foi baixa, com uma meia-vida de eliminação de 6,11 h (Tabela 16) para os grupos infectados. Como ensaio pré-clínico, os dados mostraram que há uma diferença importante entre os grupos infectados e os não infectados, isso provavelmente ocorre devido a lesões no fígado. À infecção humana apresenta as mesmas características, particularmente no fígado, devido à hepatotoxicidade associada com o antígeno dos ovos e com as lesões fibróticas (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Sendo assim todos os medicamentos prescritos para este tratamento devem ter a sua dose ajustada, uma vez que o problema ocorre no fígado e este é o principal órgão metabólico.

5.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 7-EPICLUSIANONA

Os resultados dos ensaios de toxicidade serão apresentados a seguir.

5.4.1 Avaliação dos Marcadores Bioquímicos de Toxicidade

As transaminases como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), entre outras aumentam como resultado de alterações metabólicas no fígado como a administração de toxina, doenças hepáticas tais como esquistossomose, cirrose, hepatite, cancro do fígado e icterícia (ROBINSON et al., 2014). Elevações moderadas, leves e graves dos níveis de ALT e AST no fígado pode ser usada para determinar a extensão do dano hepático (WANG et al., 2015).

ALT e AST são enzimas que ajudam as atividades químicas dentro das células. Essas enzimas são liberadas no sangue quando há lesão celular, entretanto os níveis aumentados de ALT e AST também podem ser devido a efeitos colaterais de fármacos.

Nos camundongos não infectados e tratados com as duas concentrações de 7-epi não houve alterações nos marcadores de toxicidade hepática, como AST e ALT, assim pode-se presumir que a 7-epi não tem efeito tóxico significativo para o fígado (Figura 24). Entretanto nos camundongos infectados a concentração sérica dessas enzimas encontra-se aumentado tanto nos grupos controles (controle e controle com

óleo) quando nos tratados com as duas concentrações de 7-epi (100 e 300 mg/kg) com isso podemos concluir que o tratamento não altera a lesão hepática.

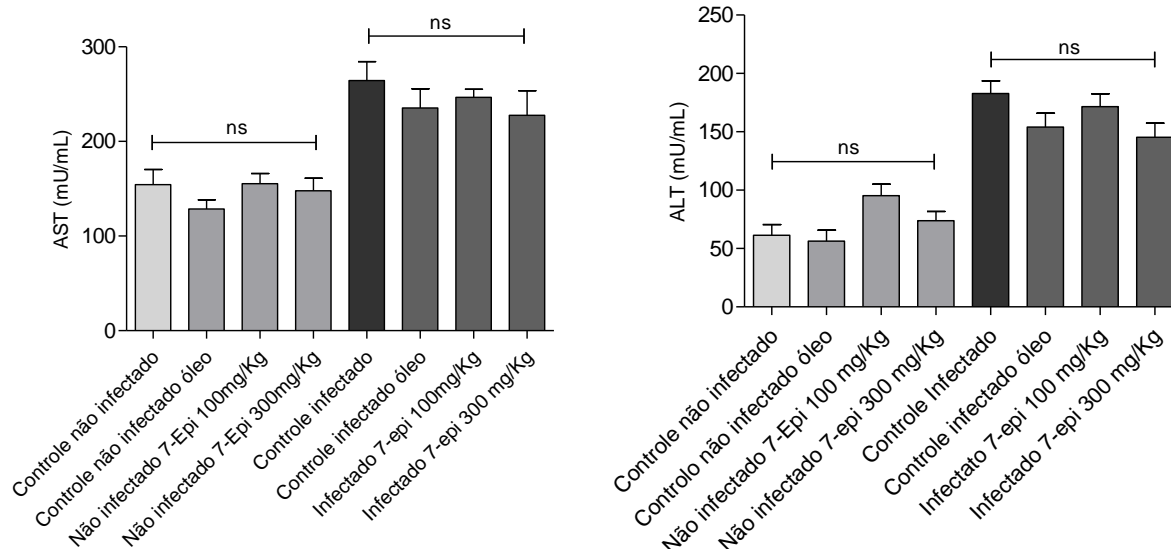


Figura 24 - Avaliação sérica da Aspartato aminotransferase (AST), da Alanina aminotransferase (ALT) nos animais do grupo não infectado e infectados (45 dias de infecção) tratados 5 dias consecutivos com 7-epiclusianona ($P < 0,05$). *ns = sem diferença estatística.

Fonte: Da autora.

Para a avaliação do comprometimento orgânico dos camundongos infectados foi realizada a dosagem da concentração de albumina sérica e de proteínas totais, 45 dias após a infecção.

A albumina é uma proteína sintetizada pelo fígado, evita que fluidos vazem dos vasos sanguíneos para os tecidos. Um fígado danificado irá sintetizar menos albumina em comparação com um fígado normal. A síntese de albumina é afetada não apenas pela doença hepática, mas também pelo estado nutricional, equilíbrio hormonal e pressão osmótica. O fígado é o único local de síntese de albumina (LYNDA et al., 2014).

Para avaliar possíveis danos hepáticos, foi dosada a concentração sérica de albumina e proteínas totais, os resultados de albumina e da proteína (Figura 25) nos camundongos não infectados indicam que a 7-epi não induziu danos hepáticos quando comparado com o controle, indicando o funcionamento normal do fígado na síntese de albumina. Nos animais infectados não houve alteração nos níveis de albumina e proteínas totais quando comparados com os animais não infectados. Os resultados aqui apresentados concordam com a hipótese defendida por SMITHERS

e WALKER (1961), além de ATTA et al. (1981) de que a hipoalbuminemia esquistossomótica é transitória, há diminuição na concentração desta proteína nos soros dos animais infectados nas 5.^a, 6.^a e 7.^a semanas e há um retorno aos níveis normais na 8.^a semana de infecção.

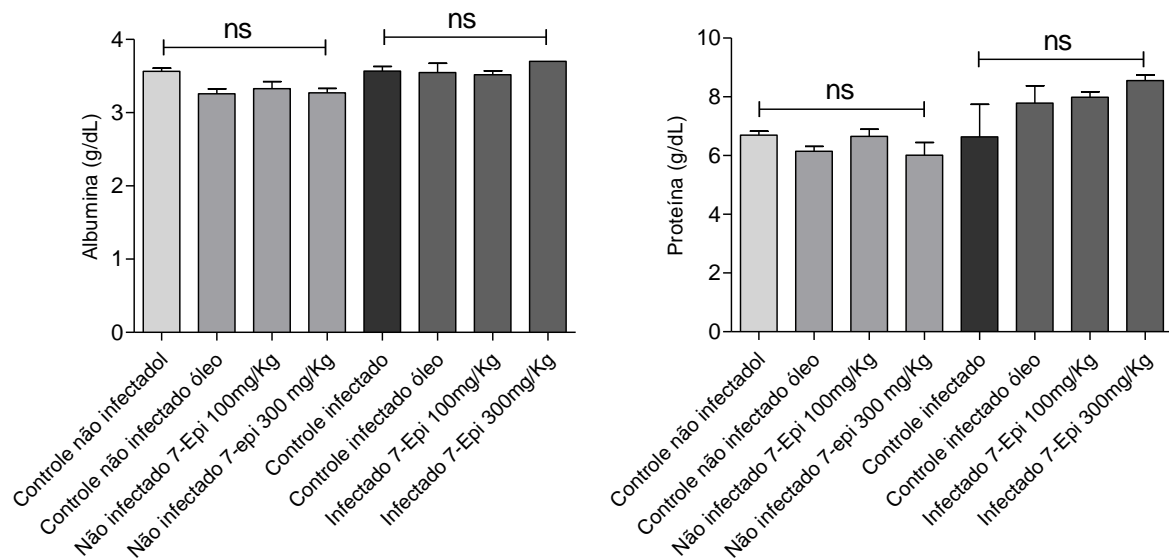


Figura 25 - Avaliação sérica da albumina e proteínas totais nos grupos não infectados e infectados (45 dias após infecção) e, tratados durante 5 dias com 7-epiclusianona ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora.

Problemas renais em decorrência da esquistossomose têm sido estudados por vários autores (DUARTE et al., 2014; EID et al., 2017; NEVES et al., 2016). Para avaliar um possível comprometimento renal, foi dosada a concentração sérica de creatinina (Figura 26). Nestas dosagens não foram observadas diferenças entre os grupos infectados e não infectados, mostrando que nem a infecção nem o tratamento com 7-epi provocou possíveis danos renais nos camundongos.

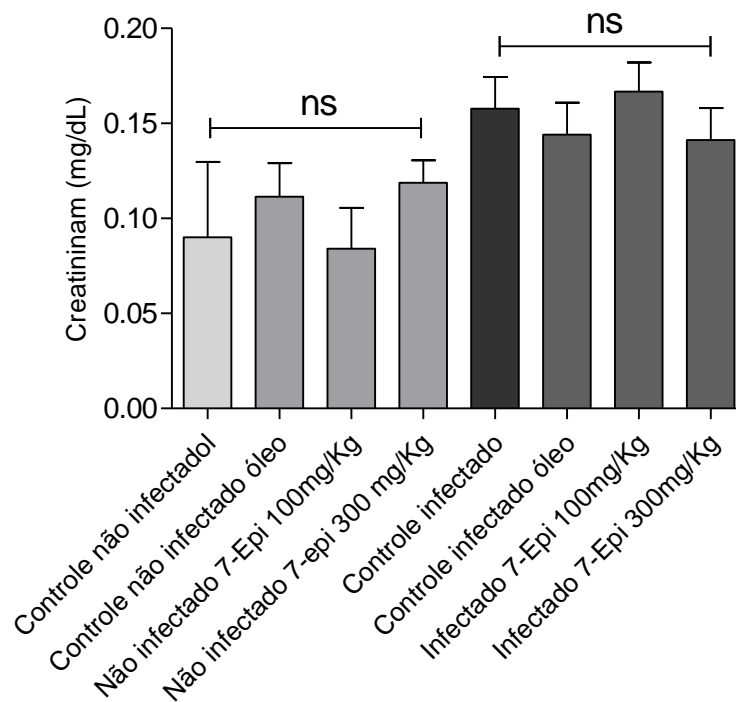


Figura 26 - Avaliação sérica da creatinina nos animais dos grupos não infectados e infectados (45 dias de infecção) tratados por 5 dias consecutivos com 7-epiclusianona ($P < 0.05$).

*ns = sem diferença estatística

Fonte: Da autora.

S. mansoni são seres anaeróbios facultativos e usam a glicose do seu hospedeiro para obtenção de energia (ALI et al., 2015). De acordo com a Figura 27 podemos observar que a 7-epi não alterou os níveis séricos de glicose nos camundongos não infectados, já nos camundongos infectados houve uma redução nos níveis séricos de glicose, entretanto a 7-epi não foi capaz de elevar esses níveis.

De acordo com ALI et al., (2015) uma consequência importante da lesão hepática é a estimulação da glicólise, que se manifesta por uma marcada redução nos níveis de glicemia plasmática, glicose hepática e glicogênio. A degradação e o reabastecimento do glicogênio ocorrem através do corpo do parasito, confirmando a inibição da respiração aeróbia e a estimulação da glicólise anaeróbica. Este metabolismo da glicose, através do glicogênio, deve ajudar a manter um baixo nível de concentração de glicose livre e assim promover a difusão de glicose suficiente para os tecidos mais profundos. Essa estimulação da glicólise também foi observada nos camundongos com 49 dias após a infecção por *S. mansoni*. No entanto, foi observada ainda uma diminuição significativa da glicose hepática para os

camundongos infectados na sexta semana após a infecção. Isto provavelmente ocorre devido à manipulação ativa e adaptação dos parasitos ao hospedeiro, também relataram que a destruição do tecido hepático resulta na incapacidade do fígado para metabolizar proteínas e gorduras ou utilizar a glicose e armazenar o glicogênio, levando a anemia e perda de peso corporal.

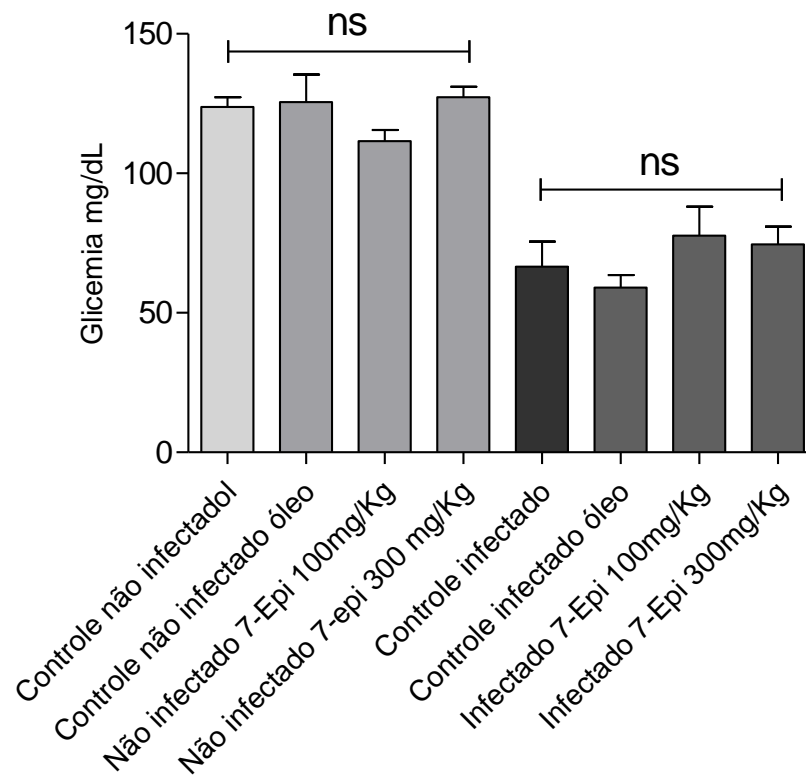


Figura 27 - Avaliação sérica da glicose nos grupos não infectados e infectados (45 dias de infecção) tratados com por 5 dias consecutivos 7-epclusianona ($P < 0,05$).

Fonte: Da autora.

*ns = sem diferença estatística

O soro contém informações importantes, cuja determinação pode servir como alvos para analisar a toxicidade de substâncias candidatas a fármacos para cura de doenças (ALI et al., 2015). Neste estudo foi possível avaliar que a 7-epi é uma substância que não induz toxicidade quando analisamos os parâmetros bioquímicos dos camundongos não infectados, entretanto ela não foi capaz de reverter os efeitos tóxicos causados pela doença.

5.4.2 Avaliação dos Efeitos Genotóxicos, Antigenotóxicos Mutagênicos e Antimutagênicos da 7-Epiclusianona

Todos os animais foram pesados a cada dois dias para verificar o desempenho de crescimento e utilização de nutrientes dos camundongos não infectados e infectados, alimentados com dieta comercial e tratados com a 7-epi.

Como mostra a Figura 28 podemos observar que através do teste de Tukey (com 5% de significância) não houve variação estatística ($p < 0,05$) significativa de consumo de ração e ganho de peso entre todos os grupos experimentais, incluindo os controles.

5.4.2.1 Análise do Teste Cometa em Células de Sangue e Fígado, Análise de Eritrócitos Micronucleados de Medula, de Colonócitos Micronucleados e Presença de Células Apoptóticas no Cólon.

Para realizar esse tipo de estudo, a DMH tem sido usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção em estudos de carcinogênese de cólon, possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (ALLAMEH et al., 2013). É considerado um agente indireto, uma vez que os produtos de seu metabolismo induzem a formação de adutos de grupos metil no DNA, mutações pontuais, separação aberrante de cromátides irmãs e induz apoptose no cólon aumentando a proliferação de colonócitos (NOVAES et al., 2016).

No presente trabalho foram realizadas análises *in vivo* a fim de avaliar os efeitos mutagênicos da 7-epi em relação aos danos que ocorrem espontaneamente. Os efeitos mutagênicos e antimutagênicos foram investigados pelos ensaios de cometa e testes de micronúcleos, utilizando-se variação entre órgãos e tipos celulares. Assim, os resultados do teste de cometa em leucócitos do sangue e em células do fígado foram comparados aos testes de micronúcleos de eritrócitos de medula óssea e complementados pelos testes de micronúcleos e apoptose de enterócitos, a fim de determinar os efeitos da 7-epi de uma forma mais ampla.

Para avaliar os possíveis efeitos protetores da 7-epi, foi escolhido, além da DMH, a DXR como controle positivo, ou seja, como agente indutor de danos ao

DNA, uma vez que esses fármacos são frequentemente empregados em investigações utilizando biomarcadores de danos no genoma.

5.4.2.1.1 Avaliação dos testes do Cometa em células do sangue e fígado

Para o teste do cometa foram utilizadas células do sangue periférico e células do fígado dos animais em estudo. Para ambos foram utilizados como *endpoints* os parâmetros *Tail length*, % de DNA *in tail* e *Tail moment*. O *Tail moment* reflete medidas do menor tamanho detectável de migração de DNA (refletido no tamanho do comprimento da cauda) e do número de quebras de DNA (representado pelo % de DNA na cauda), demonstrando a relação entre as quebras e o arraste do material genético (JAIN et al., 2015).

O comprimento da cauda de cometas (*Tail length*) expressa proporcionalmente a magnitude do dano causado ao DNA das células analisadas, uma vez que, quanto mais e menores forem os fragmentos do nucleóide, maior arraste apresentarão durante a corrida de eletroforese, sendo a % de DNA *in Tail*, representa a densidade de partículas de DNA durante a quebra do material genético (Figura 29) (GORE et al., 2016).

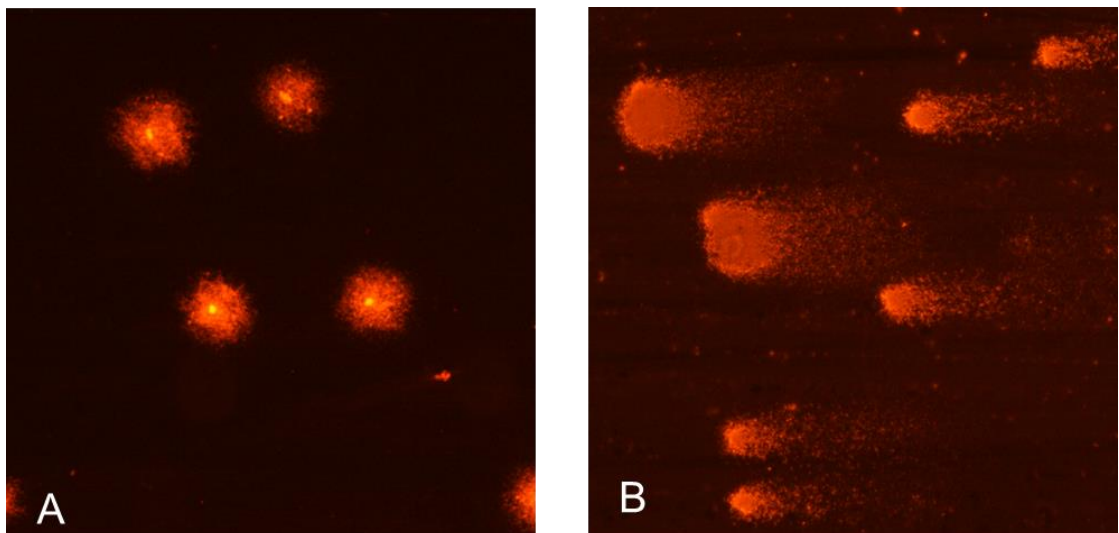


Figura 28 - Teste do Cometa analisado em microscópio Nikon RI2, com aumento de 20x. A: Grupo controle tratado com Na Cl 0,9% célula sem danos no DNA; B: células com extenso dano no DNA grupo tratado com DXR.

Fonte: da autora.

Os resultados da avaliação dos cometas no software *Comet Score* mostraram diferenças entre o controle negativo NaCl 0,9%(G3) e positivo DXR (G1) em todos os parâmetros analisados, em ambos os testes, evidenciando a sensibilidade do método para detectar lesões genômicas.

Lesões persistentes no DNA podem levar a um aumento da mutagênese pela maior probabilidade de ocorrerem erros devido a uma replicação em molde alterado, as quais podem ser superiores a capacidade de correção do sistema de reparo (BAUSINGER; SPEIT, 2016).

Analisando o parâmetro comprimento da cauda nas células do fígado (% de *Tail lenght*) (Figura 30) foi possível observar que a 7-epi 2 (grupo G8 50 mg /Kg de 7-epi + DXR) (50,32%) e a 7-epi 3 (grupo G9 100 mg /Kg de 7-epi + DXR) (55,91%) foram capazes de proteger a célula dos danos causados pelo agente anti-neoplásico DXR (grupo G1) (100,0%), da mesma forma, no parâmetro momento da cauda (% *Tail moment*) (Figura 30) essa proteção também foi observadas na 7-epi 2 (40,58%) entretanto na % de DNA na cauda (% de DNA *in tail*) (Figura 30) essa proteção não foi observada nas 3 doses analisadas, 7-epi 1(grupo G7 10 mg /Kg de 7-epi + DXR) (91,7%), 7-epi 2 (67,2) e 7-epi 3 (90,2%). Nos grupos tratados com NaCl com as três diferentes concentrações de 7-epi quando comparados com o controle negativo NaCl 0,9% foi possível observar que a 7-epi não induz lesão no DNA das células do fígado em nenhum dos três parâmetros avaliados e no grupo dos animais infectados foi observado, nos três parâmetros, que a doença não foi capaz de induzir lesão no DNA das células do fígado.

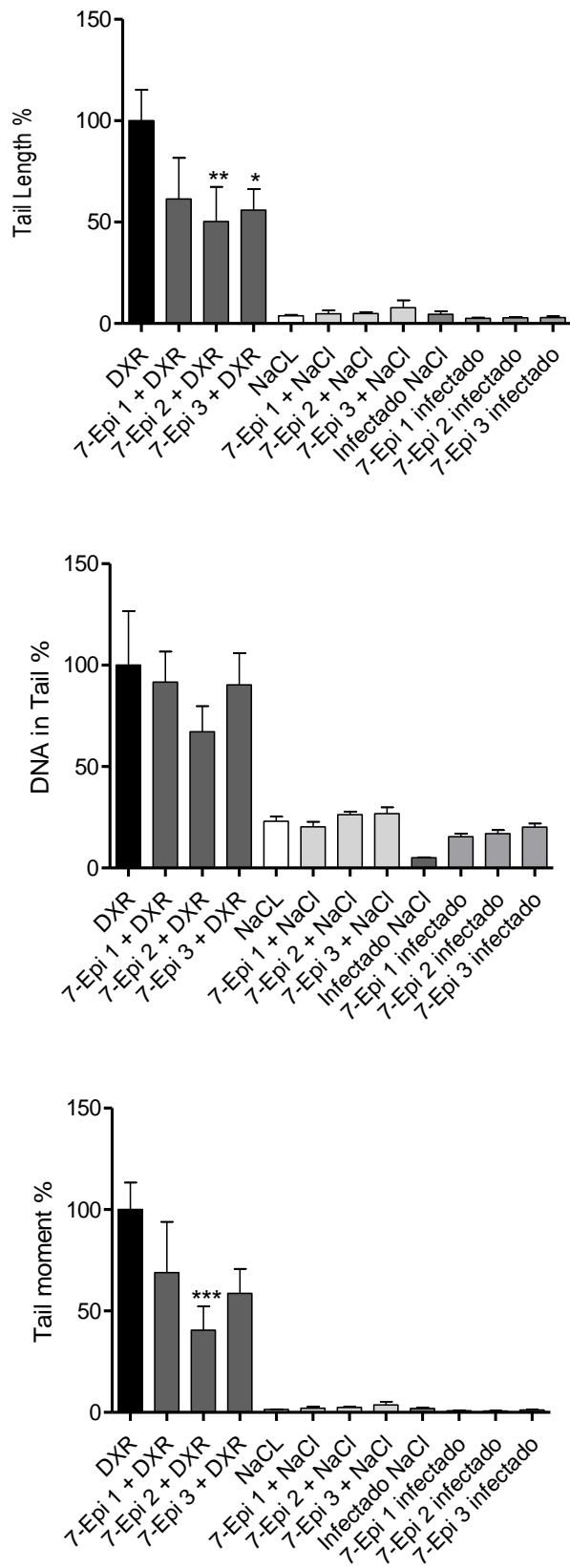


Figura 29 - Cometa em células do fígado: *Tail Length* – comprimento da cauda, % *DNA in Tail* - % DNA na cauda, *Tail Moment* – momento da cauda, de cometas dos grupos; n = 8. ***p<0,05.

Fonte: Da autora.

Analisando os parâmetros do cometa nos leucócitos de sangue periférico podemos observar que nos parâmetros % de comprimento da cauda e % de momento da cauda as 3 doses de 7-epi foram capazes de proteger a célula dos danos causados pela DXR, 7-epi 1 (70,63%), 7-epi 2 (15,93%) e 7-epi 3 (33,3%), 7-epi 1 (62,87%), 7-epi 2 (5,19%) e 7-epi 3 (6,95%), respectivamente. Já no parâmetro % de DNA (Figura 31), as duas maiores doses apresentaram efeito protetor 7-epi 2 (32,86%) e 7-epi 3 (21,96%). Nos grupos tratados com NaCl com as três diferentes concentração de 7-epi quando comparados com o controle negativo NaCl 0,9% foi possível observar que a 7-epi não induz lesão no DNA das células do fígado em nenhum dos três parâmetros avaliados e no grupo dos animais doentes foi observado, nos três parâmetros quando comparados com o controle negativo NaCl 0,9%, que a doença não foi capaz de induzir lesão no DNA das células do sangue.

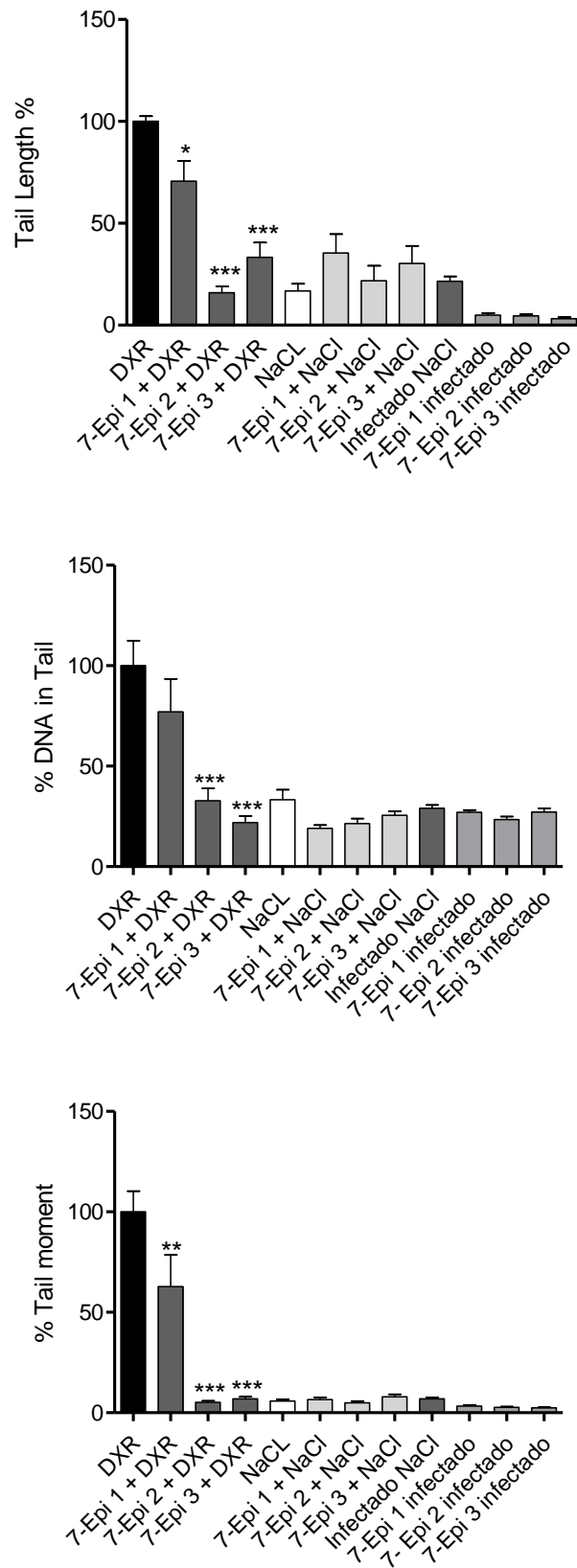


Figura 30 - Cometa em leucócito de sangue periférico - *tail length* – comprimento da cauda, % DNA in Tail - % DNA na cauda, *Tail Moment* – momento da cauda, de cometas dos grupos; n = 8. ***p<0,05.

Fonte: Da autora.

Nossos resultados apontam que a 7-epi não induziu genotoxicidade nos leucócitos do sangue nem nas células do fígado dos animais não infectados, em nenhuma das três concentrações avaliadas (10,0, 50,0 e 100,0 mg/Kg). Ainda foi possível observar que as maiores concentração de 7-epi (50 e 100 mg/Kg) protegeu as células do sangue e do fígado, dos animais não infectados, do efeito genotóxico da DXR. Também foi possível concluir que a doença não induz genotoxicidade para células do sangue e do fígado.

Da mesma forma estudos feitos para avaliar a mutagenicidade e os efeitos antimutagênico de *Roupala montana* (FRANCIELLI DE OLIVEIRA et al., 2014), Silimarina (BORGES et al., 2016) e Camu Camu (LANGLEY et al., 2015) demonstraram que essas substâncias não foram capazes de induzir mutagenicidade sendo ainda capaz de proteger a célula contra a ação citotóxica de um agente mutagênico.

5.4.2.1.2 Avaliação dos eritrócitos de medula e de colonócitos micronucleados

O Teste de MN é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e de agentes aneugênicos (que induz aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). O MN é uma estrutura presente no citoplasma de células em divisão, que possui características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal e são formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros que atrasam durante a anáfase. Eles aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células-filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, que será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo (ARALDI et al., 2015).

O teste de micronúcleos pode detectar efeitos citotóxicos com a razão PCE/NCE. Quando a proliferação normal das células da medula óssea é afetada por um agente citotóxico, há uma redução no número de eritrócitos imaturos, PCE em comparação com o número de eritrócitos maduros, NCE, reduzindo assim a taxa de PCE/NCE (AQUINO; PERAZZO; MAISTRO, 2011)

Avaliando o grupo positivo/DXR, foi possível observar (Tabela 16) um aumento significativo na frequência de MNPCE (3,41% de células micronucleadas) quando comparada ao grupo de controle negativo NaCl 0,9% (0,81% de células micronucleadas), validando o ensaio *in vivo*. Para analisar o efeito antimutagênico da 7-epi, foram comparados os grupos G7, G8 e G9 que receberam diferentes concentrações de 7-epi (10,0 50,0 e 100,0 mg/kg) e tratados com DXR (30 mg/kg), com o grupo controle positivo(G1/DXR) dos animais não infectados.

Foi possível observar que a exposição dos animais às diferentes concentrações da 7-epi (G7, G8 e G9) induziram redução na frequência de MN (Tabela 16), correspondente a 81,21%, 43,71% e 60,75%, nas doses de 10 mg/kg; 50 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente. Comparativamente, estes valores foram menores que os apresentados no grupo controle positivos (G1/DXR). Demonstra-se, assim, que há efeito protetor da 7-epi sobre as células da medula óssea de camundongos expostos à droga indutora DXR (30,0 mg/kg)

Em relação ao controle negativo (G3/NaCl) dos animais não infectados, comparados com os grupos (G10, G11 e 12) que receberam as três diferentes concentrações da 7-epi com NaCl 0,9% (m/v), não houve diferença estatística ($p < 0,05$) significativa, demonstrando que essa substância não apresenta efeitos tóxico/mutagênicos acima do espontâneo.

Tabela 16 - Os efeitos da 7-epiclusionona nas frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de camundongos

(continua)

| Grupos/tratamento | Nº de Celulas | PCE | NCE | PCE/NCE | MNPCE | %MN | MN Redução (%) | % de dano |
|---------------------------|---------------|-------|-------|---------|-------|-------|----------------|-----------|
| G1/Controle Positivo DXR | 6/12000 | 454.5 | 295.6 | 1.5 | 15.5 | 3.41 | | 100 |
| G7/Epi 1 + DXR | 8/16000 | 645.9 | 354.1 | 1.8 | 8.4 | 1.30* | 81.21 | 38.02231 |
| G8/Epi 2 + DXR | 7/14000 | 495.0 | 379.4 | 1.3 | 11.3 | 2.27* | 43.71 | 66.64223 |
| G9/Epi 3 + DXR | 7/14000 | 665.2 | 491.3 | 1.4 | 12.2 | 1.83* | 60.75 | 53.63439 |
| G3/Controle Negativo NaCl | 9/18000 | 681.0 | 434.4 | 1.6 | 5.5 | 0.81* | | 23.68197 |
| G10/Epi 1 + NaCl | 6/1200 | 486.1 | 263.3 | 1.8 | 2.3 | 0.46* | | 13.57178 |
| G11/Epi 2 + NaCl | 7/14000 | 593.0 | 407.0 | 1.5 | 6.1 | 1.04* | | 30.37511 |
| G12/Epi 3 + NaCl | 7/14000 | 509.8 | 365.3 | 1.4 | 4.6 | 0.91* | | 26.6046 |
| G13/infectados + 7-epi 1 | 6/12000 | 461.4 | 288.6 | 1.6 | 5.0 | 1.08* | | 31.77738 |
| G14/infectados + 7-epi 2 | 8/16000 | 591.9 | 405.1 | 1.5 | 8.1 | 1.37* | | 40.25275 |
| G15/infectados + 7-epi 3 | 5/10000 | 399.3 | 225.8 | 1.8 | 3.0 | 0.75* | | 22.03325 |

Tabela 16 - Os efeitos da 7-epiclusianona nas frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea de camundongos

| Grupos/tratamento | N° de Celulas | PCE | NCE | PCE/N CE | MNPC E | %MN | (conclusão) | |
|-----------------------|------------------|-------|-------|-------------|-----------|-------|-------------------|--------------|
| | | | | | | | MN Redução (%) | % de dano |
| G16/infectados + NaCl | 7/14000 | 529.1 | 345.9 | 1.5 | 6.6 | 1.25* | | 36.71384 |

DXR: doxorubicina 30,0 mg/kg; NaCl: 0.9%10,0 mL/kg (veículo); Epi 1: 10,0 mg/kg; Epi 2: 50,0 mg/kg; Epi 3: 100,0 mg/kg.; NCE: eritrócito normocromático; PCE: eritrócito policromático; MN:

células micronucleadas. 2.000 células analisadas/animal; n= número animais por grupo. $p < 0.05$ (X^2).

Fonte: Da autora.

* Diferença estatística quando se compara o controle positivo DXR (G1) e os demais grupos.

Quando se analisa o grupo controle infectado com *S. mansoni* (G16) observou que a doença induz mutação quando comparada com o grupo controle negativo (G3). Esse efeito tóxico não é tão acentuado quanto o da DXR, mas demonstrou ser diferente do controle negativo, pois o dano está acima do espontâneo (0,81%) (Tabela 17).

O teste de MN de cólon vem sendo muito utilizado devido ao fato das células epiteliais intestinais serem as primeiras a ter contato com os resultados da ingestão alimentar e compostos. Além disso, estas células possuem grande capacidade de *turnover* (renovação), facilitando a detecção de efeitos clastrogênicos e aneugênicos em compostos químicos não detectados pelo teste de micronúcleo de medula (UNO et al., 2015)

A identificação de efeito lesivo em enterócitos do cólon pela presença de micronúcleos foi realizada comparando-se que os grupos experimentais tratados com a 7-epi nas três diferentes concentrações, com o controle negativo (G3) e com o grupo controle positivo (G2) que recebeu 30 mg/kg de DMH.

A validação deste ensaio *in vivo* foi dada pela resposta do grupo positivo/DMH (Tabela 17), o qual exibiu aumentos significativos na frequência de MN (1,65% de células micronucleadas) quando comparada ao grupo controle negativo/NaCl (0,44% de células micronucleadas).

Observou-se que a exposição dos animais não infectados às diferentes concentrações da 7-epi (G4, G5 e G6) + DMH, também induziram a diminuição na frequência de MN nos colonócitos (Tabela 17), apresentando redução de micronúcleos de 74,38; 99,17 e 96,22% nas três doses de 10,0, 50,0 e 100,0 mg/kg, respectivamente, quando comparados com o controle positivo (G2/DMH).

Estes resultados confirmam também o efeito protetor da 7-epi nas três doses avaliadas em relação à substância indutora DMH, sobre as células do epitélio intestinal em todas as concentrações analisadas.

Tabela 17 - Efeitos da 7-epiclusianona em frequências de colonócitos micronucleados

| Grupos/Tratamentos | Total de células | Total de Criptas | Células/cripta | Total de células micronucleadas | % MN | % Redução MN | % dano |
|------------------------|------------------|------------------|----------------|---------------------------------|-------|--------------|---------|
| G2/DMH | 6,000 | 151 | 39.74 | 99 | 1.65 | | 100 |
| G4/Epi 1 + DMH | 6,000 | 151 | 39.74 | 45 | 0.75* | 74.38 | 45.4545 |
| G5/Epi 2 + DMH | 6,000 | 186 | 32.26 | 27 | 0.45* | 99.17 | 27.2727 |
| G6/Epi 3 + DMH | 7,000 | 188 | 37.23 | 34 | 0.48* | 96.22 | 29.4372 |
| G3/NaCl | 5,000 | 130 | 38.46 | 22 | 0.44* | | 26.6667 |
| G10/Epi 1 + NaCl | 5,000 | 132 | 37.88 | 27 | 0.54* | | 32.7273 |
| G11/Epi 2 + NaCl | 6,000 | 194 | 30.93 | 37 | 0.61* | | 37.3737 |
| G12/Epi 3 + NaCl | 5,000 | 130 | 38.46 | 18 | 0.36 | | 21.8182 |
| G13/infectados + Epi 1 | 7,000 | 166 | 42.17 | 45 | 0.64* | | 38.961 |
| G14/infectados + Epi 2 | 6,000 | 143 | 41.96 | 39 | 0.65* | | 39.3939 |
| G15/infectados + Epi 3 | 5,000 | 120 | 41.67 | 31 | 0.62* | | 37.5758 |
| G16/infectados + NaCl | 5,000 | 132 | 37.88 | 26 | 0.52 | | 31.5152 |

DMH: N,N-dimetilhidrazina 30,0 mg/kg; NaCl: 0.9% 10,0 mL/kg. $p < 0.05$ (X^2).

Fonte: Da autora.

* Diferença estatística quando se compara o controle positivo DMH (G2) e os demais grupos

Da mesma forma dos enterócitos na medula óssea, os grupos (G10, G11 e 12) que receberam as diferentes concentrações da 7-epi + NaCl não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) significativa comparados com o controle negativo (G3/NaCl), demonstrando novamente que essa substância não apresenta efeitos tóxico/mutagênicos além do espontâneo.

Nos animais infectados com *S. mansoni*, o grupo controle negativo (G16/doente + NaCl) não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle negativo dos animais sadios (G3/NaCl), indicando que o parasito não induz mutação.

A diminuição do número de micronúcleos observado em colonócitos e eritrócitos policromáticos de medula óssea dos animais que foram tratados com a 7-epi indica que houve proteção aos danos causados pelas drogas indutoras (DXR para medula óssea e DMH para o cólon), ou seja, os danos não foram perpetuados e transmitidos para as células filhas durante a multiplicação celular.

O presente estudo demonstrou que a 7-epi além de não apresentar efeito genotóxico, foi capaz de reduzir os danos cromossômicos induzidos pela DXR e DMH nos ensaios de micronúcleo. Contudo a capacidade em reduzir a frequência de MNPCs induzidas pela DXR e pela DMH é uma indicação de que a 7-epi pode vir a ser uma potente e promissora substância quimiopreventiva.

Quanto a análise dos efeitos mutagênicos nossos resultados estão em acordo com Carvalho-Silva et al. (2012) que demonstraram que a 7-epi não causou efeitos mutagênicos, pois não foi capaz de induzir danos (micronúcleo) no DNA de células de medula óssea de camundongos. Quanto aos efeitos antimutagênicos, estudo demonstram que alguns produtos naturais tais como, *Copaifera lansdorffii* (ALVES et al., 2013), *Styrax camporum* (FRANCIELLI DE OLIVEIRA et al., 2012) e *Solanum lycocarpum* (MUNARI et al., 2014) além de não apresentarem efeitos citotóxicos foram capazes de reduzir a ação citotóxica do agente mutagênico.

5.4.2.1.3 Avaliação de células apoptóticas de cólon

Quanto a apoptose, deve-se considerar que ela ocorre nas mais diversas situações como, por exemplo, a hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos, desempenhando um papel crucial na resposta de tumores ao tratamento. (MUKHOPADHYAY et al., 2014; WEBER et al., 2013).

A possível indução à apoptose foi estudada no epitélio intestinal (Figura 34) por ser um evento de grande importância na erradicação de células que tenham sofrido danos no DNA devido a presença de compostos mutagênicos e/ou genotóxicos (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

Desequilíbrios na homeostase celular podem levar ao crescimento celular desordenado e desenvolvimento do câncer. A regulação dos processos de apoptose também tem sido associada a diferentes processos de oncogênese, incluindo iniciação, progressão e metástase. Além de estar relacionada a doenças autoimunes, Parkinson e Alzheimer (WEBER et al., 2013). Desta forma os resultados relativos a apoptose são complementares aos demais testes desse experimento, os quais representam uma resposta protetora da benzofenona 7-epi para a fase de iniciação do processo carcinogênico.

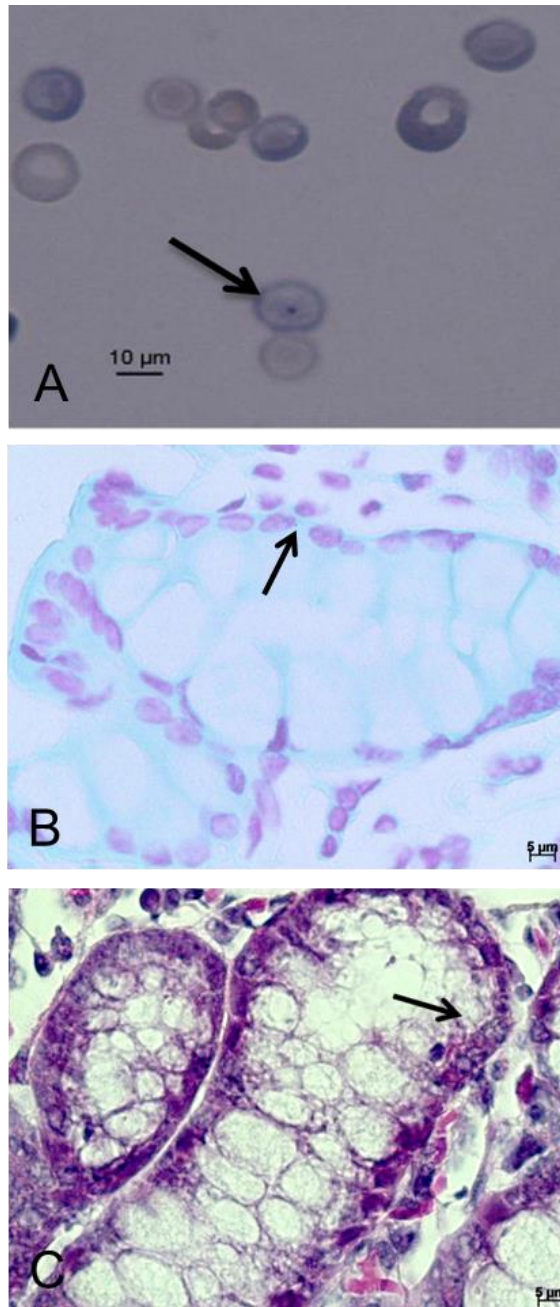


Figura 31 - (A): Perfil de danos avaliados em eritrócitos na medula óssea 24 horas após administração de 30,0 mg/ Kg de DXR. Eritrócito micronucleados em objetiva de 100x, a seta indica presença de MN. Fonte: Silva,2014.(B): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24horas após administração de 30,0 mg/kg de DMH. Colonócitos micronucleados em objetiva de 100x, a seta indica presença de MN. Fonte: da autora. (C): Perfil de danos avaliados em epitélio do cólon 24 horas após administração de 30,0 mg/kg de DMH. Célula apoptótica em objetiva de 100x a seta indica presença de célula em apoptose. Fonte: da autora

A sensibilidade deste ensaio *in vivo* foi demonstrada pela resposta do grupo positivo/DMH, o qual exibiu aumentos significativos na frequência de apoptoses (4,04% de células apoptóticas) quando comparada ao grupo de controle negativo/NaCl (1,79% de células apoptóticas) (Tabela 18). As três concentrações da 7-epi estudadas apresentaram efeito protetor das lesões mutagênicas comparados com o grupo negativo (5% de significância, χ^2), apresentando redução de 55,73, 82,53 e 111,29% de células apoptóticas, respectivamente. A redução do número de apoptoses indica que a 7-Epi protegeu as células dos danos ao DNA, não houve significativo desequilíbrio na homeostase celular quando comparado com o grupo controle positivo da substância indutora DMH. Conseqüentemente não precisaram ser ativados por mecanismos de morte celular. A proteção é constatada pelo nível de apoptose em escala semelhante ao grupo controle negativo, evidenciando apoptoses que ocorreram de forma espontânea nos animais (Tabela 18).

Nos animais infectados com *S. mansoni*, o grupo controle negativo (G16/infectados + NaCl) não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle negativo dos animais não infectados (G3/NaCl), indicando que o parasito não induz processo de apoptose.

Tabela 18 - Efeitos da 7-epiclusianona em frequências de apoptose

| Grupos/Tratamento | Criptas total | Células total | Célula/cripta | Apoptose total | % Células Apoptóticas | Desvio Padrão | % Redução Apoptoses |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------------|
| G2/DMH | 100 | 2991 | 29,91 | 106 | 4,04 | 0,92 | |
| G4/Epi 1 + DMH | 100 | 2961 | 29,61 | 82 | 2,79* | 0,72 | 55,73 |
| G5/Epi 2 + DMH | 120 | 3356 | 27,97 | 73 | 2,18* | 0,53 | 82,53 |
| G6/Epi 3 + DMH | 140 | 4095 | 29,25 | 62 | 1,54* | 0,31 | 111,29 |
| G3/NaCl | 80 | 2202 | 27,53 | 39 | 1,79* | 0,44 | |
| G10/Epi 1 + NaCl | 80 | 2149 | 26,86 | 42 | 1,98* | 0,65 | |
| G11/Epi 2 + NaCl | 120 | 3675 | 30,63 | 67 | 1,95* | 0,77 | |
| G12/Epi 3 + NaCl | 80 | 2143 | 26,79 | 45 | 2,13* | 0,53 | |
| G13/infectados + Epi 1 | 100 | 3256 | 32,56 | 55 | 1,87* | 1,05 | |
| G14/infectados + Epi 2 | 100 | 3183 | 31,83 | 90 | 3,00* | 1,74 | |
| G15/infectados + Epi 3 | 60 | 2097 | 34,95 | 61 | 2,96* | 1,08 | |
| G16/Doente + NaCl | 100 | 3396 | 33,96 | 74 | 2,30* | 1,04 | |

DMH: N,N' - dimetilhidrazina 30,0 mg kg⁻¹ m.c.; NaCl: 0.9% 10 mL kg⁻¹ m.c.; Epi 1: 10,0 mg/kg; Epi 2: 50,0 mg/kg; Epi 3: 100,0 mg/kg. $p < 0.05$ (χ^2).

A benzofenona 7-epi apresentou efeito protetor às mutações nos eritrócitos policromáticos e em células de contato intestinal, além da resistência ao processo de apoptose em enterócitos. Segundo FELICIDADE et al. (2014), qualquer substância capaz de reduzir a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação, são consideradas antimutagênicas. Sendo assim, a 7-epi pode ser considerada antimutagênica.

Esses resultados apresentados no presente estudo *in vivo* condizem com os estudos feitos por ROCHA-SALES et al. (2016) que confirmaram as relações estrutura-atividade e a utilidade potencial da benzofenona prenilada, a 7-epi, como uma substância com atividades antitumoral. Da mesma forma, confirma os estudos *in vitro* de SALES et al. (2015) de que a 7-epi é um agente natural promissor que apresenta múltiplos efeitos inibitórios na proliferação de células cancerosas.

5.5 ESTUDO ESQUISTOSSOMICIDA

Os resultados obtidos com os camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* (cepa LE), tratados com 7-epi a 100 e 300 mg / kg de peso corporal / dia, durante cinco dias consecutivos, por via oral e eutanásicos no dia seguinte ao esquema de tratamento pode seja visto na Tabela 19.

Não houve alterações no oograma de todos os grupos avaliados. Além disso, a média de vermes recuperados das veias mesentéricas dos animais tratados com 300 mg/Kg (11,6) foi menor do que os animais tratados com 100 mg / Kg (18,75); controle de óleo (21,0) e controle (26,7, $p < 0,05$).

Tabela 19 - Média + DP dos resultados obtidos dos camundongos infectados experimentalmente com ± 100 cercas de *Schistosoma mansoni* (cepa LE), tratados com 7-epi por via oral (por cinco dias), 45 dias após a infecção e eutanasiados um dia após o tratamento (n = 18)

| Esquema de tratamento | Animais (n) | | Média da distribuição de vermes + DP | | Alteração no oograma |
|------------------------|-------------|------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| | Tratados | Examinados | Mesentério | Fígado | |
| Controle | 18 | 14 | 26.7 \pm 10.9 | 0.7 + 1.2 | 0 |
| Controle óleo de milho | 18 | 13 | 21 \pm 9.6 | 0.7 + 0.9 | 0 |
| 100 mg/Kg | 18 | 16 | 18.75 \pm 19.9 | 2.5 + 2.0 | 0 |

(continua)

Tabela 19 - Média + DP dos resultados obtidos dos camundongos infectados experimentalmente com ± 100 cercas de *Schistosoma mansoni* (cepa LE), tratados com 7-epi por via oral (por cinco dias), 45 dias após a infecção e eutanasiados um dia após o tratamento (n = 18)

| Esquema de tratamento | Animais (n) | | Média da distribuição de vermes + DP | | Alteração no oograma |
|-----------------------|-------------|------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| | Tratados | Examinados | Mesentério | Fígado | |
| 300 mg/Kg | 18 | 16 | 11.6 \pm 5.9 | 1.1 + 1.1 | 0 |

* Diferença estatística entre o grupo controle e grupo tratado com 300 mg / kg. p <0,05; SD: desvio padrão

Fonte: da autora.

Neste estudo, o 7-epi provou ter uma promissora atividade antiesquistossomicida *in vivo* quando administrado por 5 dias consecutivos a dose de 300,0 mg/Kg de peso corporal. Um único fármaco utilizado no tratamento de uma doença com um significado público global como a esquistossomose corre o risco de facilitar o desenvolvimento e a disseminação de cepas resistente aos medicamentos especialmente porque a susceptibilidade reduzida vem sido demonstrada com frequência no campo e no laboratório (VALE et al., 2017). Nesse sentido, justifica-se a busca de alternativas para o tratamento desta parasitose (RODER; THOMSON, 2015).

Muitas plantas vêm sendo estudadas para investigar seu potencial esquistossomicídio (TEKWU et al., 2017), como *Baccharis trimera* (DE OLIVEIRA et al., 2014b), a epiisopiloturina isolada de *Pilocarpus microphyllus* (GUIMARÃES et al., 2015); o *Zingiber officinale* (MOSTAFA et al., 2011), *Allium cepa* (MAHMOUD; RIAD; TAHA, 2016) e *Mentha vilosa* (MATOS-ROCHA et al., 2013). E, mais recentemente, nosso grupo publicou um trabalho sobre atividade schistosomicida *in vitro* de 7-epi (Castro et al., 2015). O 7-epi mostrou ser um composto esquistossomicida promissor, mas testes *in vivo* foram relatados como necessários para a continuidade dos estudos.

(COUTO et al., (2011) observaram que PZQ a 200,0 mg/kg de peso corporal em uma única dose oral poderia recuperar 9.7 (média) de vermes adultos de camundongos infectados com *S. mansoni*. No presente estudo, foi possível mostrar uma recuperação muito próxima (12,6) de vermes adultos usando 300,0 mg/kg de peso de 7-epi durante cinco dias. Embora esses resultados sejam preliminares eles apontam para a importância de continuar estudos *in vivo* usando diferentes regimes de tratamento e formulações de 7-epi para melhorar sua eficácia.

5.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ANIMAIS INFECTADOS

Os resultados da análise dos granulomas dos animais infectados com *S. mansoni* e tratados com 7-epi nas doses de 100 e 300 mg/Kg são apresentados na Figura 32.

Estes estudos confirmaram em parte os resultados parasitológicos. O fígado esquistossômico mostrou formação de granuloma celular fibroso com necrose central, tecido fibroso e condensado e infiltração de eosinófilo e neutrófilo em torno do ovo. Devido a essas alterações, os processos metabólicos do fígado, como armazenamento de glicogênio e metabolismo de gordura ficam prejudicados (MAHMOUD; RIAD; TAHA, 2016).

No entanto, o tratamento com 7-epi apresentou redução (46,0%) significativa ($p < 0,05$) no diâmetro dos granulomas (Figura 32) no fígado dos camundongos infectados pela esquistosomose.

A fibrose hepática devido a esquistosomose geralmente resulta de reações inflamatórias crônicas induzida por antígenos de ovos presos nos espaços sinusoidais. A maioria dos distúrbios fibróticos crônicos tem em comum uma irritação tecidual persistente, a qual contribui para a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e fibrogênicos, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, que em conjunto estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que progressivamente remodelam e destroem a arquitetura do tecido normal (FABRE et al., 2011).

As células endoteliais estão presentes em grandes números dentro do granuloma periovular (FABRE et al., 2011). Estudos *in vitro* têm demonstrado que antígenos solúveis do ovo do *S. mansoni* (SEA) induzem a proliferação de células endoteliais e também regulam a produção de fator de crescimento do epitélio vascular (VEGF) e a angiogênese (MADALA et al., 2010). As células epiteliais e/ou endoteliais produzem metaloproteinase da matriz (MMP), que rompe a membrana basal, permitindo um recrutamento eficiente de células inflamatórias para o local da lesão, como também secretam fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas que recrutam e ativam neutrófilos, macrófagos, células B, células T e eosinófilos, que são componentes importantes no reparo tecidual e conseqüentemente na formação de granuloma (MADALA et al., 2010).

Uma vez que estudos demonstraram que a 7-epi apresenta atividade anti-inflamatória (SANTA-CECÍLIA et al., 2011a, 2011b), pode-se propor que um dos seus alvos seria as metaloproteases já que essa enzima é a responsável pelo recrutamento de células inflamatórias para o local onde o ovo está inserido,

Em contraste, quando o número de granulomas hepáticos foi avaliado não se observou mudança significativa nos camundongos tratados com 7-epi quando estes foram comparados com os animais infectados e não tratados. Achados semelhantes foram encontrados por outros autores (SHARAF EL-DEEN; BRAKAT; MOHAMED, 2017), quando avaliaram o efeito da alcachofra sobre o fígado de camundongos infectados.

Os granulomas são formações nodulares em que células de exsudato são exibidas em arranjos particulares para o foco inflamatório, formando estruturas com aspectos peculiares e arquitetura que frequentemente permitem diagnosticar a doença mesmo sem encontrar o agente causal. Os macrófagos e seus derivados (células epiteliais e gigantes) e células linfoides e seus derivados (particularmente células plasmáticas) compreendem as células necessárias no processo inflamatório. As células acessórias são compostas por eosinófilos que em certos casos, podem prevalecer sobre as outras células, de modo que nos granulomas surgem quase exclusivamente eosinófilos, como é observado durante a fase aguda precoce da forma tóxica da esquistossomose. Em outros casos, porém mais raros, os neutrófilos podem prevalecer (RASO et al., 2012; SANCHEZ et al., 2017). Neste estudo foi avaliado a presença de eosinófilo e neutrófilo presente nos granulomas hepáticos mostrando que houve um aumento significativo no número de neutrófilos e uma diminuição no número de eosinófilo (45,0%). (Figura 32).

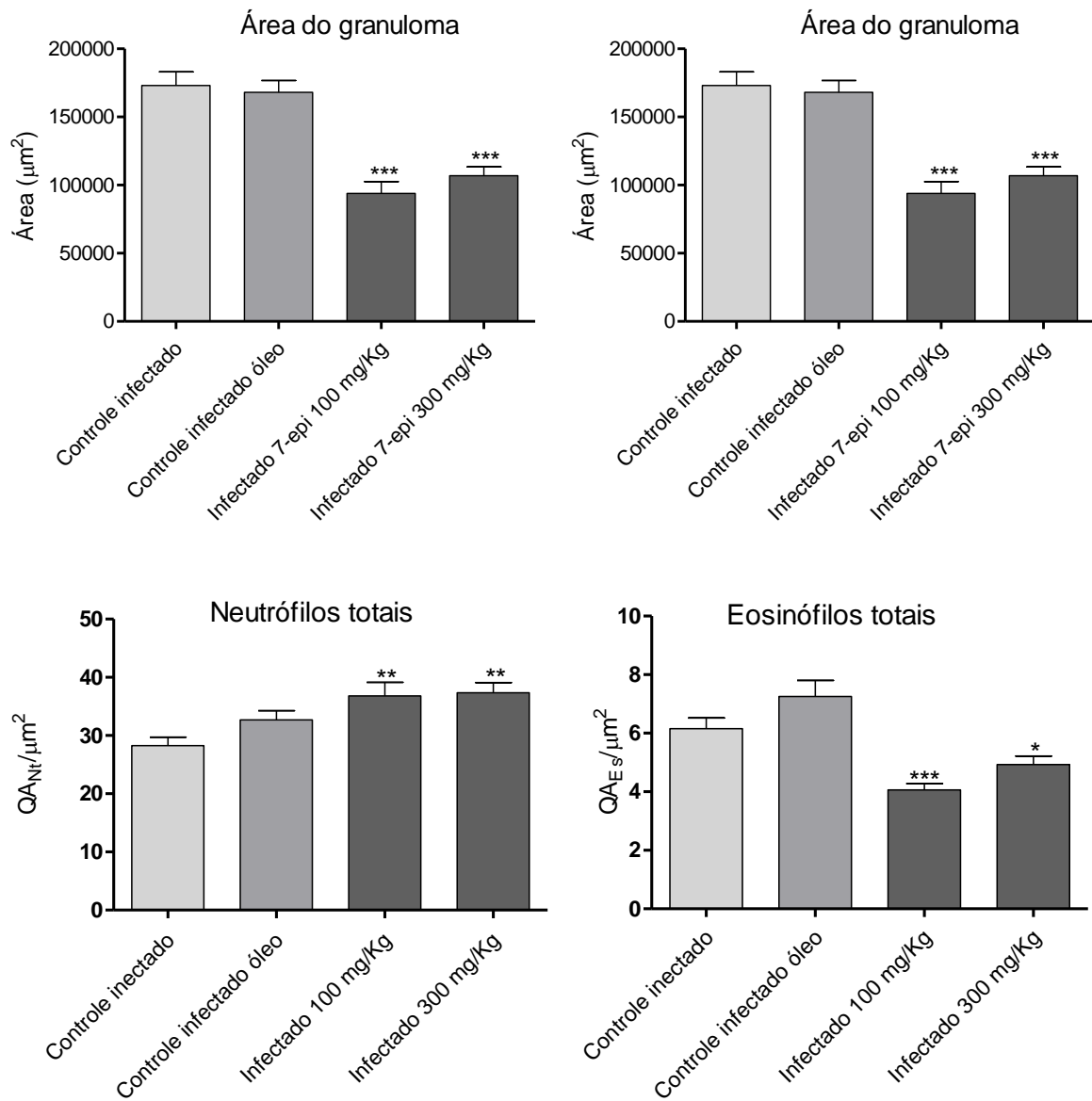


Figura 32 - Densidade de número (QA) e área do granuloma esquistossomótico no fígado de camundongos infectados e tratados com 7-epiclusianona.

Notas: gt, granulomas totais; Nt, neutrófilos, Es eosinófilos. Os resultados para cada grupo estão representados como média \pm desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos comparando com o grupo controle infectado (***) $p < 0,05$), teste Bartlett's test.

Fonte: da autora.

6 CONCLUSÕES

1) 7-EPI mostrou uma maior estabilidade térmica e química após condições de degradação forçada; No entanto, a degradação do 7-epi ocorreu no estresse oxidativo, levando à detecção de um importante produto de degradação oxidativo., indicando que um átomo de oxigênio foi estabilizado por equilíbrio cetoenólico entre duas porções de carbonila após uma reação com radical livre. Desta forma, o método analítico proposto neste estudo foi uma abordagem efetiva para a determinação do 7-epi em sua forma isolada, bem como para determinar seu produto de degradação oxidativo, identificado como uma nova benzofenona prenilada que não foi relatada anteriormente.

2) Nos testes farmacocinéticos foi possível avaliar que a 7-epi foi absorvido adequadamente após a administração oral em camundongos não infectados e infectados porém nos infectados a eliminação foi mais baixa, com tempo de meia-vida de eliminação alta.

3) Diante dos dados demonstrados neste trabalho, pode-se concluir que a 7-epi não altera os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo demonstrando que essa substância não apresenta toxicidade hepática e renal, entretanto essa substância não foi capaz de proteger esses órgão dos danos causados pela infecção por *S mansoni*.

4) Quanto aos testes *in vivo* para avaliação da toxicidade da 7-epi, a partir dos resultados obtidos no teste de cometa, testes de micronúcleo de medula óssea, micronúcleo de cólon e apoptose, pode-se observar que a 7-epi não provocou danos ao DNA e foi capaz de proteger dos danos provocados pela DXR e DMH.

5) Nos testes *in vivo* para avaliar a atividade esquistosossomicida da 7-epi frente aos camundongos infectados, essa substância apresentou atividade na dose de 300 mg/Kg quando comparado com o controle infectado

6) Quando o fígado foi histopatologicamente avaliado, após administração da 7-epi, este não apresentaram diferença no número de granulomas, entretanto o diâmetro dos granulomas apresentaram diminuição significativa assim como o número de eosinófilos.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ZIED, A. M. et al. Biochemical and Parasitological Studies on the Effect of hUCB-Selected CD34+ Progenitor/Stem Cells in Mice Infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 98–107, 30 nov. 2014.
- AKIN, D. et al. Assessment of antimutagenic action of *Celtis glabrata* Steven ex Planch. (Cannabaceae) extracts against base pair exchange and frame shift mutations on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains by Ames test. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 312–321, 2 jul. 2016.
- ALI, M. et al. *Schistosoma mansoni*: Antiparasitic effects of orally administered *Nigella sativa* oil and/or *Chroococcus turgidus* extract. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 3, p. 247–260, set. 2016.
- ALI, S. A.; EL-REGAL, N. S.; SAEED, S. M. Antischistosomal Activity of Two Active Constituents Isolated from the Leaves of Egyptian Medicinal Plants. **Infect Dis (Auckl)**, v. 8, p. 5–16, jun. 2015.
- ALLAM, G. et al. Ellagic acid reduces murine schistosomiasis mansoni immunopathology via up-regulation of IL-10 and down-modulation of pro-inflammatory cytokines production. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 38, n. 4, p. 286–297, 3 jul. 2016.
- ALLAMEH, A. et al. Effect of dietary caraway essential oils on expression of β -catenin during 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 690–697, 15 out. 2013.
- ALVES, J. M. et al. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 854–860, ago. 2013.
- ANDRADE, G. et al. Decline in infection-related morbidities following drug-mediated reductions in the intensity of *Schistosoma* infection: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005372, 17 fev. 2017.
- ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1–3, p. 137–143, nov. 1998.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. **Brasília**, 2010.
- AQUINO, I.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1335–1339, jun. 2011.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, maio 2015.

ATTA, A. M.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. DE A. Esquistossomose mansônica: II - evolução dos níveis de proteínas séricas e do perfil eletroforético por técnicas de imunoeletoforese quantitativa. **Revista de Saúde Pública**, v. 15, n. 2, abr. 1981.

AZEVEDO, L. et al. *Black bean (Phaseolus vulgaris L.)* as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1671–1676, 2003.

AZEVEDO, L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melano-gen*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 852–858, 2007.

AZEVEDO, L. et al. *In vivo* antimutagenic properties of transgenic and conventional soybeans. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1402–1408, 2010.

AZQUETA, A. et al. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 25 ago. 2014.

BARRETO, A. V. M. S. et al. Evaluation of serum levels of IL-9 and IL-17 in human *Schistosoma mansoni* infection and their relationship with periportal fibrosis. **Immunobiology**, v. 221, n. 12, p. 1351–1354, dez. 2016.

BAST, A. et al. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 195–211, 2002.

BAUSINGER, J.; SPEIT, G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay. **Mutagenesis**, v. 31, n. 5, p. 567–572, set. 2016.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 74, 28 dez. 2017.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs — A review. v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BONESSO-SABADINI, P. I. P.; DE SOUZA DIAS, L. C.; DIAS, L. C. DE S. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 381–5, abr. 2002.

BORGES, F. F. V. et al. Antimutagenic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Activities of *Silybum Marianum* [L.] Gaertn Assessed by the Salmonella Mutagenicity Assay (Ames Test) and the Micronucleus Test in Mice Bone Marrow. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 5, p. 848–855, 3 jul. 2016.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso

científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: **Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para assuntos jurídicos**, [s.d.].

BRASIL. Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil. Brasília: MS/SVS. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Grupo Técnico das Parasitárias**, p. 18 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/porta>, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N ° 26 , DE 13 DE MAIO DE. v. 75, 2012.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Genotoxicity and Mutagenicity Assays for Selection of Chemical Compounds with Therapeutic Potential: A Short Commentary. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 4, 2015.

BUGSSA, G. A Survey of Intestinal Parasitic Infections among Dega Ochollo Primary School Children, Ochollo, South Ethiopia. **Science Journal of Public Health**, v. 3, n. 1, p. 56, 2015.

BURTIS CA, A. E. **Testbook of Clinical Chemistry**. 4. ed. Philadelphia: [s.n.].

CAGEL, M. et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 270–281, fev. 2017.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 109–17, 2008.

CARVALHO-SILVA, L. B. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 180–186, ago. 2012.

CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 9, p. 733–741, 23 abr. 2015.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141–50, mar. 2014.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, jun. 2014.

COELHO, L.; SERRA, M. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. ... of **Pharmacology and ...**, 2008.

COELHO, P. M. Z.; ENK, M. J.; KATZ, N. Treatment of clinical schistosomiasis at the prepatent phase: an option? **Trends in parasitology**, v. 25, n. 7, p. 299–300, jul. 2009.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9936, p. 2253–64, 28 jun. 2014.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 17 fev. 2008.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 794–800, fev. 2014.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. et al. Evaluation of DNA Single and Double Strand Breaks in Women with Cervical Neoplasia Based on Alkaline and Neutral Comet Assay Techniques. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

COSTA, R. DE J. et al. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 86–93, 2008.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 13–9, jan. 2004.

COUTO, F. F. B. et al. *Schistosoma mansoni*: A method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 153–157, mar. 2011.

CRELLEN, T. et al. Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* Is Associated With Multiple Rounds of Mass Drug Administration. **Clinical Infectious Diseases**, p. ciw506, 28 jul. 2016.

DAVIS, G. M. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. **Progress in clinical parasitology**, v. 3, p. 145–204, jan. 1993.

DE ALMEIDA, L. et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania(L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 93–99, out. 2015.

DE ALMEIDA, L. M. S. et al. Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

DE LA TORRE-ESCUADERO, E. et al. Schistosome infections induce significant changes in the host biliary proteome. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 71–82, jan. 2015.

DE OLIVEIRA, R. N. et al. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*.

Experimental Parasitology, v. 139, n. 1, p. 63–72, 2014a.

DE OLIVEIRA, R. N. et al. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 63–72, abr. 2014b.

DE RUITER, K. et al. The effect of three-monthly albendazole treatment on Th2 responses: Differential effects on IgE and IL-5. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 6, p. e12428, jun. 2017.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5–32, 2009.

DIAS, M. C. et al. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 877–884, jun. 2006.

DIEGO, M. DE et al. Chemical stability of enalapril maleate drug substance and tablets by a stability-indicating liquid chromatographic method. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 450–454, 2011.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, mar. 2003.

DOS SANTOS, M. H. et al. 7-epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654–660, set. 1999.

DUARTE, D. B. et al. Renal Function in Hepatosplenic Schistosomiasis – An Assessment of Renal Tubular Disorders. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115197, 22 dez. 2014.

EID, R. A. et al. Ultrastructural changes of kidney in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Ultrastructural Pathology**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 3 set. 2017.

EL-BANHAWAY, M. A et al. Effect of Curcuma longa or parziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice liver--histological and histochemical study. **Indian journal of experimental biology**, v. 45, n. 10, p. 877–89, out. 2007.

ELKADY, E. F.; FOUAD, M. A. Forced degradation study to develop and validate stability-indicating RP-LC method for the determination of ciclesonide in bulk drug and metered dose inhalers. **Talanta**, v. 87, p. 222–229, dez. 2011.

ELSHEIKHA, H. M.; HUSSEIN, H. S.; RAHBAR, M. H. Clinico-pathological effects of *Schistosoma mansoni* infection associated with simultaneous exposure to malathion in Swiss outbred albino mice. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 11–19, out. 2008.

FABRE, V. et al. Tissue inhibitor of matrix-metalloprotease-1 predicts risk of hepatic

fibrosis in human *Schistosoma japonicum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 5, p. 707–714, 1 mar. 2011.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002490, jan. 2012.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83–8, jul. 1994.

FELICIDADE, I. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of crude hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on cultured meristematic cells *Allium cepa*. **Vedic Research International Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 30, 1 jan. 2014.

FERNÁNDEZ-ÁLVARO, E. et al. Antimalarial Chemotherapy: Natural Product Inspired Development of Preclinical and Clinical Candidates with Diverse Mechanisms of Action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 5587–5603, 23 jun. 2016.

FRANCIELLI DE OLIVEIRA, P. et al. *In Vivo* Protective Activity of *Styrax camporum* Hydroalcoholic Extract against Genotoxicity Induced by Doxorubicin and Methyl Methanesulfonate in the Micronucleus and Comet Assays. **Planta Medica**, v. 78, n. 18, p. 1899–1905, 19 dez. 2012.

FRANCIELLI DE OLIVEIRA, P. et al. Antigenotoxicity of *Roupala montana* extract in the mouse micronucleus and comet assays. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 93–99, 7 jan. 2014.

GALINIER, R. et al. First characterization of viruses from freshwater snails of the genus *Biomphalaria*, the intermediate host of the parasite *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 167, p. 196–203, mar. 2017.

GANNON, S. A. et al. Absorption, distribution, metabolism, excretion, and kinetics of 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(heptafluoropropoxy)propanoic acid ammonium salt following a single dose in rat, mouse, and cynomolgus monkey. **Toxicology**, v. 340, p. 1–9, jan. 2016.

GOMES E, DIAS LCS, TAKAKU L, S. G. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema Valley (Ourinhos). **São Paulo, Brasil. IV International Symposium on Schistosomiasis**, p. 51, 1993.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230–1235, jun. 2012.

GOODSON, W. H. et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. **Carcinogenesis**, v. 36 Suppl 1, p. S254-96, jun. 2015.

- GORE, P. R. et al. Protective Effect of Thymoquinone against Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis through Inhibiting DNA Damage and Upregulation of Nrf2 Expression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 944–953, 2016.
- GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–18, 23 set. 2006.
- GU, W.; ZHANG, F.; LUPSKI, J. R. Mechanisms for human genomic rearrangements. **PathoGenetics**, v. 1, n. 1, p. 4, 2008.
- GU, X.; MANAUTOU, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 14, p. e4, 2012.
- GUIMARÃES, M. A. et al. Anthelmintic Activity *In Vivo* of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003656, 2015.
- HALL, Z. et al. Degradation of Artemisinin-Based Combination Therapies Under Tropical Conditions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 993–1001, 4 maio 2016.
- HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: Friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. APR, p. 89, 2013.
- HAYTA, S.; POLAT, R.; SELVI, S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 613–623, jul. 2014.
- HOWE, S. et al. Lactate as a novel quantitative measure of viability in *Schistosoma mansoni* drug sensitivity assays. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1193–9, fev. 2015.
- ICH guidelines Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products.** International Conference on Harmonization. **Anais...2003 International Conference on Harmonisation (ICH). Stability Testing of New Drugs Substances and Products, Q1A (CPMP/ICH/2736/99).** **Anais...Geneva: 1999**
- JAIN, A. et al. Curcumin inhibits PhIP induced cytotoxicity in breast epithelial cells through multiple molecular targets. **Cancer Letters**, v. 365, n. 1, p. 122–131, ago. 2015.
- JAIN, D.; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11–35, dez. 2013.
- J PELLEGRINO, A. S. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Rev. bras. Malar**, v. 8, p. 589–597, 1956.
- JAURÉGUIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Difficulties in the diagnosis and treatment of acute schistosomiasis. **Clinical infectious diseases : an official**

publication of the **Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 8, p. 1163-4-5, 15 abr. 2009.

JAU RÉG UIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 225–31, mar. 2010.

KAPADIA, G. J. et al. Antiparasitic activity of menadione (vitamin K3) against *Schistosoma mansoni* in BABL/c mice. **Acta Tropica**, v. 167, p. 163–173, mar. 2017.

KATZ, N. et al. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, n. 6, p. 381–387, dez. 1973.

KATZ, N. et al. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 5, p. 509–12, maio 1991.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. **Acta tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 72–8, 2008.

KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; PEREIRA, J. P. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis III: laboratory and clinical trials with trichlorphone, an organophosphorus compound. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, n. 5, p. 237–245, out. 1968.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561–9, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873–99, ago. 2011.

KIRSZTAJN, G. M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, ago. 2007.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422–35, jul. 2010.

LANGLEY, P. C. et al. Antioxidant and Associated Capacities of Camu Camu (*Myrciaria dubia*): A Systematic Review. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 1, p. 8–14, jan. 2015.

LEE, E.-W. et al. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. **BMB reports**, v. 45, n. 9, p. 496–508, set. 2012.

LI, J.; XU, Q.; JIANG, H. Identification and Characterization of Two New Degradation

Products of Saikosaponin A under Acid Hydrolytic Conditions. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1232, 14 set. 2016.

LIU, X.-M. et al. Comparative pharmacokinetics of five saponins after intravenous administration of TSFS injection and TSFS injection plus TFFG in rats under different physiological states. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 53–62, fev. 2014.

LYNDA A ALLAN, HELEN L. KUTIMA, SHADRACK MUYA, DARLENE AYONGA, D. Y. The Efficacy of a Herbal Drug, Schitozim over Praziquantel in the Management of *Schistosoma mansoni* Infection in BALB/c mice. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 2224–3208, 2014.

MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, v. 189, p. 103–112, 1987.

MADALA, S. K. et al. Matrix Metalloproteinase 12-Deficiency Augments Extracellular Matrix Degrading Metalloproteinases and Attenuates IL-13-Dependent Fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3955–3963, 1 abr. 2010.

MAHMOUD, Y.; RIAD, N.; TAHA, H. Garlic attenuates histological and histochemical alterations in livers of *Schistosoma mansoni* infected mice. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 91, n. 6, p. 389–395, 17 ago. 2016.

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1230–9, mar. 2009.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of mentha x villosa and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, n. 14, p. 1307–1312, set. 2013.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after *in vitro* incubation with the essential oil of Mentha x villosa Huds. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, 2016.

MELO, E. V. DE et al. A comparative cross-sectional study on the prevalence and morbidity of schistosomiasis in a community in northeastern Brazil (1979-2010). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 340–4, jun. 2014.

MENDONÇA, A. M. B. et al. THE SUSCEPTIBILITY OF RECENT ISOLATES OF *Schistosoma mansoni* TO PRAZIQUANTEL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

MIZERA, M. et al. Prediction of HPLC retention times of tebipenem pivoxyl and its degradation products in solid state by applying adaptive artificial neural network with recursive features elimination. **Talanta**, v. 137, p. 174–181, maio 2015.

MOOLENBEEK, C.; RUITENBERG, E. J. The “Swiss roll”: a simple technique for

histological studies of the rodent intestine. **Laboratory animals**, v. 15, n. 1, p. 57–59, 1981.

MOSTAFA, O. M. S.; EID, R. A.; ADLY, M. A. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 395–403, ago. 2011.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? **Apoptosis**, v. 19, n. 4, p. 555–566, 12 abr. 2014.

MUNARI, C. C. et al. *In Vivo* Assessment of Genotoxic, Antigenotoxic and Anticarcinogenic Activities of *Solanum lycocarpum* Fruits Glycoalkaloidic Extract. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111999, 18 nov. 2014.

MURATA, R. M. et al. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS microbiology letters**, v. 282, n. 2, p. 174–81, maio 2008.

MURATA, R. M. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865–72, out. 2010.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 2, p. 403–7, abr. 2009.

NEVES, B. J. et al. In Silico Repositioning-Chemogenomics Strategy Identifies New Drugs with Potential Activity against Multiple Life Stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3435, 8 jan. 2015.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta medica**, v. 73, n. 7, p. 644–9, jun. 2007.

NEVES, P. D. M. M. et al. *Schistosoma mansoni* and membranous nephropathy. **Kidney International**, v. 89, n. 4, p. 959, abr. 2016.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–9, 2013.

NOVAES, R. D. et al. Depletion of enteroendocrine and mucus-secreting cells is associated with colorectal carcinogenesis severity and impaired intestinal motility in rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 1, p. 3–13, jan. 2016.

OLIVEIRA, A. L. DE P. et al. Calebin A: Analytical Development for Pharmacokinetics Study, Elucidation of Pharmacological Activities and Content Analysis of Natural Health Products. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication**

of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, **Societe canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 18, n. 4, p. 494–514, 2015.

OLVEDA, D. U. et al. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 193–203, nov. 2014.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, 1984.

PAKADE, V. E.; LESAOANA, M.; TAVENGWA, N. T. Effect of pH, Time and Temperature on Forced Degradation Studies of Quercetin in Presence of Polymers. **Asian Journal of Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2181–2187, 2016.

PAPAMOKOS, G.; SILINS, I. Combining QSAR Modeling and Text-Mining Techniques to Link Chemical Structures and Carcinogenic Modes of Action. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 30 ago. 2016.

PELLEGRINO, J. et al. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 11, p. 201–215, mar. 1962.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, fev. 2007.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 5, p. 339–45, abr. 2010.

PEREIRA, T. A. et al. Osteopontin Is Upregulated in Human and Murine Acute *Schistosomiasis mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005057, 18 out. 2016.

POZHARISSKI, K. M. et al. Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. **Advances in cancer research**, v. 30, p. 165–237, 1979.

RAO, R. N. et al. Development and validation of a stability indicating assay of doxofylline by RP-HPLC: ESI-MS/MS, 1H and 13C NMR spectroscopic characterization of degradation products and process related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78–79, p. 92–99, maio 2013.

RASO, P. et al. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627–632, out. 2012.

REIS, L. F. et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifillyne on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96 Suppl, p. 107–12, 2001.

RIAD, N. H. A.; TAHA, H. A.; MAHMOUD, Y. I. Effects of garlic on *Schistosoma mansoni* harbored in albino mice: Molecular characterization of the host and parasite. **Gene**, v. 518, n. 2, p. 287–291, 2013.

RICHTER, J. et al. Severe liver fibrosis caused by *Schistosoma mansoni*: management and treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 731–737, jun. 2015.

ROBINSON, O. et al. Hirni Valley liver disease: A disease associated with exposure to pyrrolizidine alkaloids and DDT. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 96–102, jan. 2014.

ROCHA-SALES, B. et al. Abstract 2844: Cell senescence and antitumor potential of 7-epiclusianone in human breast cancer cell lines cultured in monolayer and as spheroids. **Cancer Research**, v. 76, n. 14 Supplement, p. 2844–2844, 15 jul. 2016.

ROCHA, J. A. et al. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 4, p. 624–630, abr. 2017.

RODER, C.; THOMSON, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. **Drugs in R and D**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 20 mar. 2015.

RUELA, A. L. M. et al. LC-PDA and LC-MS Studies of Donepezil Hydrochloride Degradation Behaviour in Forced Stress Conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.

SALES, L. et al. Anticancer activity of 7-epiclusianone, a benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 393, 30 dez. 2015.

SANCHEZ, M. C. et al. Effect of praziquantel on the differential expression of mouse hepatic genes and parasite ATP binding cassette transporter gene family members during *Schistosoma mansoni* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005691, 26 jun. 2017.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 467–473, 27 jan. 2011a.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European journal of pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280–5, 16 nov. 2011b.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 2, p. 200–5, fev. 2012.

SARONI ARWA, P. et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage.

Journal of Ethnopharmacology, v. 174, p. 410–418, nov. 2015.

SAVIOLI, L. et al. Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 65, 23 dez. 2017.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SHARAF EL-DEEN, S. A.; BRAKAT, R. M.; MOHAMED, A. S. E. D. Artichoke leaf extract protects liver of *Schistosoma mansoni* infected mice through modulation of hepatic stellate cells recruitment. **Experimental Parasitology**, v. 178, p. 51–59, jul. 2017.

SINGH, K. P. et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 343–352, mar. 2004.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SMITHERS, S. R.; WALKER, P. J. Serum protein changes in monkeys infected with *Schistosoma mansoni*, with special reference to the metabolism of albumin. **Experimental Parasitology**, v. 11, n. 1, p. 39–49, fev. 1961.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 305–11, 2010.

SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* L., Asteraceae, aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 98–104, fev. 2011.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay. In: **DNA Repair Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 275–286.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, n. 1, p. 5, 2009.

TANG, H. et al. Soluble Egg Antigen Activates M2 Macrophages via the STAT6 and PI3K Pathways, and *Schistosoma Japonicum* Alternatively Activates Macrophage Polarization to Improve the Survival Rate of Septic Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, 23 maio 2017.

TAO, K.-S. et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical hypotheses**, v. 71, n. 5, p. 730–6, nov. 2008a.

TAO, K. S. et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, v. 71, n. 5, p. 730–736, 2008b.

TEKWU, E. M. et al. *In Vitro* Assessment of Anthelmintic Activities of Rauwolfia vomitoria (Apocynaceae) Stem Bark and Roots against Parasitic Stages of Schistosoma mansoni and Cytotoxic Study. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

THRALL M.A. ET. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.

TOFFOLI DA SILVA, G. et al. 5-lipoxygenase pathway is essential for the control of granuloma extension induced by *Schistosoma mansoni* eggs in lung. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 124–129, ago. 2016.

TOUSSON, E. et al. Expressions of P53 and CD68 in mouse liver with *Schistosoma mansoni* infection and the protective role of silymarin. **Toxicology and industrial health**, v. 29, n. 8, p. 761–70, set. 2013.

UNO, Y. et al. Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 783, p. 19–22, maio 2015.

VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: Single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02582-16, maio 2017.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation research**, v. 536, n. 1–2, p. 79–90, 2003.

VANHAUWAERT, A; VANPARYS, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. The *in vivo* gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 39–50, jan. 2001.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, abr. 2006.

WANG, B. et al. Th17 Down-regulation Is Involved in Reduced Progression of Schistosomiasis Fibrosis in ICOSL KO Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e0003434, 15 jan. 2015.

WANG, L. et al. Synthesis and biological evaluation of Oblongifolin C derivatives as c-Met inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4120–4128, set. 2016.

WEBER, T. G. et al. Noninvasive Monitoring of Pharmacodynamics and Kinetics of a Death Receptor 5 Antibody and Its Enhanced Apoptosis Induction in Sequential Application with Doxorubicin. **Neoplasia**, v. 15, n. 8, p. 863–874, ago. 2013.

WHO. **Ministry of Health, Department of Health Surveillance, Information System of Schistosomiasis Control Program, and Diseases Information System, Confirmed Cases of Schistosomiasis. Brazil, Major Regions and Federative Units. From 1995 to 2011, Ministry of H.** 2012

WHO. Schistosomiasis. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>, p. accessedo 20 de julho 2014, 2014.

WILLIAM, S. et al. Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitology**, v. 122 Pt 1, p. 63–6, jan. 2001.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148–154, 2007.

WORETA, T. A.; ALQAHTANI, S. A. Evaluation of Abnormal Liver Tests. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 1, p. 1–16, jan. 2014.

XU, M.-J. et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 692–702, fev. 2015.

YOU, H. et al. Suppression of the Insulin Receptors in Adult *Schistosoma japonicum* Impacts on Parasite Growth and Development: Further Evidence of Vaccine Potential. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003730, 11 maio 2015.

ZAPATA, L. M. et al. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108–116, maio 2016.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? **Mutation research**, v. 626, n. 1–2, p. 1–3, 2007.

ZHANG, P. Determination of the upper cut-off values of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in Chinese. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 8, p. 2419, 2015.

ZHANG, Q. et al. Pharmacokinetics difference of multiple active constituents from decoction and maceration of Fuzi Xiexin Tang after oral administration in rat by UPLC-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 92, p. 35–46, abr. 2014.