



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

LUANA MARIA MARIZ GOMES DA SILVA

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXÓIS (LqIT/NW)
CANDIDATOS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Recife-2018

LUANA MARIA MARIZ GOMES DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Co-orientadores: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima

Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife-2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

- S586a Silva, Luana Maria Mariz Gomes da.
Avaliação biológica de novos derivados benzodioxóis (IqIT/NW)
candidatos a fármacos esquistossomicidas / Luana Maria Mariz Gomes da
Silva. – Recife: o autor, 2018.
96 f.; il.; 30 cm.
- Orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas.
Inclui referências, figuras, tabelas e anexos.
1. Esquistossomose. 2. Benzodioxóis. 3. Praziquantel. I. Albuquerque,
Mônica Camelo Pessoa de Azevedo (orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 066)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Luana Maria Mariz Gomes da Silva

Título da Qualificação da Tese de Doutorado: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXÓIS (LqIT/NW) CANDIDATOS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Aprovada em: 23/02/2018

Banca Examinadora

Profª Drª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque– Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profª Drª. Edna de Farias Santiago–Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura- Universidade Estadual da Paraíba

Assinatura: _____

Profª Drª Lívia Bandeira Costa – Centro Univeristário Maurício de Nassau

Assinatura: _____

Profª Drª Andresa Pereira de Oliveira Mendes – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO
A Deus, a meus pais e a meu noivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus toda honra e toda glória eternamente, sem Ele nada poderia ser feito. Aos meus pais (Marcos Caetano e Irene Mariz), que sempre me deram força nos momentos mais difíceis, ajudando-me a buscar algo melhor para minha vida e por serem minha inspiração, minha força motriz, meu apoio, minha base. Obrigada por todos os anos em que o suor dos seus trabalhos manteve os meus estudos.

Ao meu noivo Jonatas, por ter tornado minha vida mais leve e mais alegre. Obrigada por sua torcida, incentivo, apoio, e por me tornar uma pessoa melhor em todas as áreas da minha vida.

Às minhas amigas (Natália e Larissa) por escutarem pacientemente sobre as partes difíceis dessa trajetória, por se solidarizarem, e por me darem sempre força para continuar.

À minha avó Clarice (*in memoriam*) por ter se mostrado sempre orgulhosa e por ter sido um exemplo de pessoa forte. Gostaria que ela também tivesse visto esse momento.

Ao grupo familiar de estudo bíblico, pela torcida e pelas orações. Ao pastor Rodrigo, por sua torcida e incentivo para que eu pudesse finalizar essa etapa da minha vida.

À professora Maria do Carmo Alves de Lima (Nena) e ao LqIT, por me ajudarem, orientarem, acalmarem e trazerem sempre soluções para problemas que pareciam impossíveis de resolver.

À Sérgio e Risoleta pelo sentimento de companheirismo, união e amizade construída durante esses anos. À Jamerson, pela ajuda inestimável na publicação do artigo, e por ter se mostrado sempre disponível para responder a minhas dúvidas e questionamentos.

À professora orientadora Mônica Camelo pela boa vontade e paciência em ensinar.

Ao professor André Aires, pelo seu trabalho duro nos experimentos e disponibilidade em passar todo o seu conhecimento aos alunos.

À Nerilin e Rilvan da Secretaria de Pós Graduação, por sua boa vontade em ajudar nas questões burocráticas e até a emprestar seus ouvidos para os problemas comuns de todos os alunos.

Aos integrantes da Banca Examinadora pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar e fortalecer o trabalho.

Ao LIKA e Departamento de Antibióticos da UFPE por permitir e oportunizar a apresentação deste trabalho.

“De longe se me deixou ver o Senhor, dizendo: Com amor eterno eu te amei; por isso, com benignidade te atraí”

Jr 31.3

RESUMO

A esquistossomose é considerada um grave problema de saúde pública e acomete 200 a 250 milhões de pessoas em todo o mundo. É uma doença parasitária e infecciosa causada por vermes tremátodos do gênero *Schistosoma*. O uso exclusivo do Praziquantel tem ocasionado o desenvolvimento de cepas resistentes, desse modo há a necessidade do surgimento de novos agentes esquistossomicidas que possam ser utilizados como alternativa para o tratamento desta parasitose. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico de novos derivados benzodioxóis (LqIT/NW) candidatos a fármacos esquistossomicidas através da avaliação da susceptibilidade *in vitro*, de Microscopia Eletrônica de Varredura e de avaliação da atividade imunomodulatória através da dosagem do óxido nítrico. Os derivados LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09 e LqIT/NW-13 se destacaram, uma vez que apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% na concentração de 200 μ M em 120 horas frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Destes, os derivados LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06 se destacaram no estudo de cinética de mortalidade avaliado a cada 24 h em 120 h, causando 100% da mortalidade dos vermes na concentração de 100 μ M, em 96 horas, 72 horas e 120 horas, respectivamente. Em particular o derivado LqIT/NW-05 foi avaliado ultraestruturalmente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo capaz de promover destruição de tubérculos, formação de bolhas, erosão e descamação no tegumento dos vermes, na concentração de 100 μ M em 24 h de observação. Este composto apresenta uma estrutura restrita, onde a tiazolidinona é ligada ao anel 1,3-benzodioxol pela posição 4. A conformação estrutural do LqIT/NW-05, provavelmente, foi responsável pela promissora atividade esquistossomicida, onde a presença de uma restrição conformacional do anel tiazolidínico, além da atuação do bromo como um substituinte volumoso favoreceu a aproximação ao alvo biológico. Além disso, o LqIT/NW-05 também apresentou um possível efeito imunomodulatório, uma vez que estimulou a produção de concentrações estatisticamente significativas de óxido nítrico. Diante disso, verificamos que os resultados obtidos neste estudo fazem dos derivados benzodioxóis possíveis candidatos a protótipos de novas drogas esquistossomicidas.

Palavras-chave: Benzodioxóis. Esquistossomose. Praziquantel.

ABSTRACT

Schistosomiasis is considered a serious public health problem and affects 200 to 250 million people worldwide. It is a parasitic and infectious disease caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*. The exclusive use of Praziquantel has led to the development of resistant strains, so there is a need for the emergence of new schistosomicidal agents that can be used as an alternative for the treatment of this parasitosis. The objective of this study was to evaluate the therapeutic potential of new benzodioxolic derivatives (LqIT / NW) candidates for schistosomiasis drugs through *in vitro* evaluation of susceptibility, Scanning Electron Microscopy and immunomodulatory activity evaluation through the measurement of nitric oxide. The LqIT/NW-04, LqIT/NW-06, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09 and LqI /NW-13 derivatives were highlighted, since they presented a 100% mortality rate at 200 μ M in 120 hours against adult *S. mansoni* worms. Of these, the LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06 derivatives were highlighted on the mortality kinetics study evaluated every 24 h in 120 h, causing 100% mortality of worms at a concentration of 100 μ M, in 96 hours, 72 hours and 120 hours, respectively. In particular, the LqIT/NW-05 derivative was evaluated ultrastructurally by Scanning Electron Microscopy (SEM) and was able to promote tuber destruction, bubble formation, erosion and sloughing in the worm tegument at a concentration of 100 μ M in 24 h of observation. This compound has a restricted structure where the thiazolidinone is attached to the 1,3-benzodioxol ring by the 4-position. The structural conformation of LqIT/NW-05 was probably responsible for the promising schistosomicidal activity, where the presence of a conformational restriction of and bromine as a bulky substituent favored the approach to the biological target. In addition, LqIT/NW-05 also showed a possible immunomodulatory effect, since it stimulated the production of statistically significant concentrations of nitric oxide. Therefore, we verified that the results obtained in this study make benzodioxolic derivatives possible candidates for prototypes of new schistosomicidal drugs.

Keywords: Benzodioxoles. Schistosomiasis. Praziquantel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição global da Esquistossomose.	20
Figura 2	Faixa de positividade (%) da Esquistossomose mansônica no Brasil e América Latina.	22
Figura 3	Distribuição geográfica dos casos de Esquistossomose e dos criadouros de <i>Biomphalaria</i> em Recife, 2012.	23
Figura 4	Reprodução assexuada nos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> , com formação de cercarias.	24
Figura 5	Corte histológico da pele. Esquistossômulo é identificado (seta) próximo ao vaso sanguíneo após 72 h de infecção. Corte corado com H&E, aumento 100x.	24
Figura 6	Ciclo biológico de vermes do <i>Schistosoma</i> .	25
Figura 7	Paciente de 12 anos antes e após esplenectomia.	27
Figura 8	Esquistossomose hepática. Fígado com fibrose periportal.	28
Figura 9	Estrutura da Lucantona, Hicantona e Niridazol.	29
Figura 10	Estrutura da Oxamniquina.	30
Figura 11	Estrutura do Praziquantel.	31
Figura 12	Estrutura da 9-acridanona-hidrazona.	36
Figura 13	Estrutura química da vinil sulfona K11777 (N-metil-piperazina ureia-fenilalanil-homofenilalanil vinil sulfona-fenil).	39
Figura 14	Comparação entre a estrutura da Artemisina e do OZ78.	39
Figura 15	Estrutura do 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-carbonitrila-2-óxido.	40
Figura 16	Estrutura química do LPSF/PT-05.	40
Figura 17	Estrutura do LPSF/FZ-04.	41
Figura 18	Estrutura da Mefloquina.	41
Figura 19	Estrutura básica da tiossemicarbazona.	43
Figura 20	Tiazóis - compostos contendo 3 carbonos, 1 átomo de nitrogênio e 1 átomo de enxofre.	44

Figura 21	Estrutura química da 4-tiazolidinona.	45
Figura 22	Estrutura química do Ftalil-tiazol LpQM-45.	45
Figura 23	Estrutura química do Safrol.	46
Figura 24	Estrutura química do Piperonal.	46
Figura 25	Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos (A1-A3) e fêmeas (B1-B3) de <i>S. mansoni</i> em meio RPMI 1640 suplementado e 1.5% DMSO.	64
Figura 26	Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos e fêmeas de <i>S.mansoni</i> tratados com PZQ (10 μ M)	65
Figura 27	Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos (A1-B4) e fêmeas (C1-D4) de <i>S.mansoni</i> incubados por 24h em LqIT/NW-05 nas concentrações de 50 e 100 μ M	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa de motilidade de vermes controle, tratados com Praziquantel (PZQ) e com derivados benzodioxóis em 120h de incubação.	55
Tabela 2	Atividade antihelmintica contra vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> e citotoxicidade contra células HeLa de derivados benzodioxóis	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Produção de Óxido Nítrico em sobrenadantes de cultura de células HeLa na presença dos derivados LqIT/NW-02, LqIT/NW-03, LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09, LqIT/NW-10, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14.	69
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

PQZ	Praziquantel
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Óxido Nítrico Induzível
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
HeLa	<i>Human Cervical Cancer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCE	Programa de Controle Nacional da Esquistossomose
PKAs	Proteína Quinase A
TGR	Tiorredoxina Glutathiona Redutase
PPAR- γ	Receptor Proliferador Ativado do Peroxissoma
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
TR	Tiorredoxina Redutase
GR	Glutathiona Redutase
CEH	Células Estreladas Hepáticas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	20
3.2	CICLO BIOLÓGICO DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	23
3.3	PATOGENIA	25
3.4	TRATAMENTO	28
3.5	HISTÓRICO E RESISTÊNCIA AO PRAZIQUANTEL (PZQ)	30
3.6	NOVOS ALVOS BIOLÓGICOS NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE	32
3.6.1	Via de Síntese das Purinas	32
3.6.2	Tiorredoxina Glutathione Redutase	33
3.6.3	Proteínas quinases	34
3.6.4	Sistema Neuromuscular	34
3.6.5	DNA Topoisomerase	35
3.6.6	Cisteína Proteases	36
3.6.7	Canais de Cálcio	37
3.6.8	PPAR- γ	38
3.7	PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS	38
3.8	NÚCLEOS MOLECULARES UTILIZADOS NA FORMAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXÓIS	42
3.8.1	Tiosemicarbazonas	42
3.8.2	Tiazolidinonas	44
3.8.3	1,3-Benzodioxol (Safrol)	46
4	METODOLOGIA	48
4.1	DERIVADOS BENZODIOXÓIS	48
4.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS HELA (<i>HUMAN CERVICAL CANCER</i>)	48
4.3	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO PELO MÉTODO DE GRIESS	49

4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	49
4.4.1	Animais	50
4.4.2	Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	50
4.4.3	Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	50
4.4.4	Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados benzodioxóis	51
4.4.5	Análise estatística	51
4.4.6	Alterações ultraestruturais de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	EFEITO <i>IN VITRO</i> DE DERIVADOS BENZODIOXÓIS SOBRE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i>	53
5.2	ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> TRATADOS COM O DERIVADO LQIT/NW-05	63
5.3	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURAS DE CÉLULAS HELA	69
6	CONCLUSÕES	72
7	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO A - New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of <i>in vitro</i> schistosomicidal activity and ultrastructural analysis	87

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é causada pelo verme trematódeo *Schistosoma mansoni*, responsável por parasitar animais e seres humanos (ELBAKRY et al, 2016; GUIDI et al, 2016; FAKAHANY et al, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que mais de 249 milhões de pessoas têm sido infectadas em 78 países onde a esquistossomose é endêmica, resultando em aproximadamente 200.000 mortes ao ano (ERAKY et al, 2016).

Esta doença figura como a segunda doença tropical mais negligenciada do mundo, perdendo apenas para a Malária. Além disso, atinge comunidades carentes onde não há acesso à água potável e estrutura sanitária adequada (OLIVEIRA et al, 2014). Das cinco espécies que infectam o homem, o *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e o *Schistosoma japonicum* são os maiores responsáveis pela alta taxa de morbidade e mortalidade, devido à formação de granuloma no intestino e no fígado. Além disso, o ciclo de vida dessas espécies é semelhante, e envolve um molusco como hospedeiro intermediário (OLVEDA et al, 2014).

O tratamento e o controle da esquistossomose baseiam-se quase que exclusivamente na quimioterapia com o Praziquantel (PZQ) (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona), que se tornou o medicamento de escolha por ser seguro, bem tolerado e eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* (OLIVEIRA et al, 2014; AIRES et al, 2014). No entanto a sua utilização em larga escala no tratamento de populações residentes em áreas de risco para a esquistossomose possibilitou a emergência de cepas resistentes a essa droga (EL-EMAM et al, 2015). Além disso, o PZQ é incapaz de afetar as formas jovens dos vermes de *Schistosoma* (FERREIRA et al, 2015).

Dentro desse contexto a Química Medicinal tem grande importância, uma vez que está envolvida com o planejamento racional de novas substâncias bioativas, permitindo a descoberta de novas entidades de interesse (AMARAL & MONTANARI, 2002). Dentre as estratégias de planejamento, desenho e modificação molecular para a descoberta de novas drogas, destaca-se a Híbridação Molecular, a qual compreende a reunião de características estruturais parciais de dois compostos bioativos distintos em uma única estrutura, originando uma nova substância. Esta

nova substância poderá apresentar a atividade de uma das moléculas originais, ou conjugar ambas as atividades em uma única molécula (BARREIRO & FRAGA, 2008). A hibridação molecular foi a estratégia utilizada para a formação das moléculas da série LqIT/NW, uma vez que os derivados benzodioxóis são formados pelos núcleos tiossemicarbazona, tiazolidinadiona e 1,3-benzodioxol.

A tiossemicarbazona já foi descrita na literatura por possuir atividades antitumoral, antimalárica, antiviral, antifúngica, antiprotozoária e citotóxica (JAGADEESH et al, 2015; BABAHAN et al, 2014; QIN et al, 2012; TENÓRIO et al, 2005; BERALDO, 2004). Já o núcleo 1,3-benzodioxol tem sido utilizado como um importante intermediário na síntese orgânica tanto na preparação de diversos produtos naturais biologicamente ativos, quanto na preparação de substâncias sintéticas originárias de programas de desenvolvimento planejado de fármacos, estando a unidade 1,3-benzodioxólica presente em diversos fármacos (COSTA, 2000; BARREIRO et al, 2001). Por fim, o núcleo tiazolidinônico possui atividades biológicas comprovadas e descritas na literatura tais como: atividade antiinflamatória, anticonvulsivante, hipnótica, antituberculosa, antibacteriana, antifúngica, anticâncer e anti-fibrótica (SHELKE et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2015).

Devido ao surgimento de casos de resistência ao Praziquantel, e também por conta do potencial biológico dos três núcleos citados, este trabalho tem como finalidade a avaliação da atividade esquistossomicida de novos derivados benzodioxóis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico de novos derivados benzodioxóis (LqIT/NW) candidatos a fármacos esquistossomicidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos novos derivados (LqIT/NW);
- Avaliar o potencial efeito imunomodulatório dos novos derivados benzodioxóis (LqIT/NW) em sobrenadantes de cultura de células HeLa através da quantificação da produção de Óxido Nítrico (NO);
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos derivados benzodioxóis (LqIT/NW) sobre vermes adultos de *S. mansoni*;
- Descrever as alterações ultraestruturais tegumentares de vermes adultos de *S. mansoni* incubados *in vitro* e tratados com o derivado mais promissor.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes trematódas do gênero *Schistosoma*. As principais espécies causadoras de infecções são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (BERGQUIST et al, 2017; MARTINS-MELO, 2014). Dentre as doenças negligenciadas, a esquistossomose está em segundo lugar no mundo com relação à infecção parasitária mais prejudicial em termos socioeconômicos, ficando atrás apenas da Malária (LAMBERTON et al, 2017; WANG et al, 2017; MARTINS-MELO, 2014). A extensão de países ou áreas em risco de todas as espécies de *Schistosoma* existentes pode ser observada na figura 1.

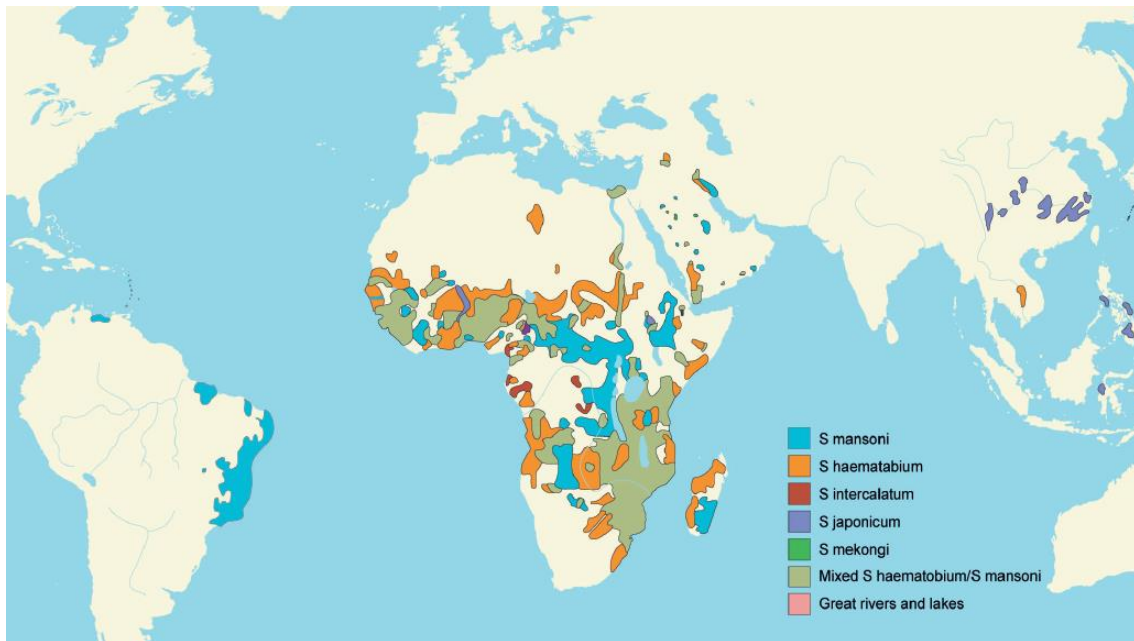


Figura 1: Distribuição global da Esquistossomose (SHAKER et al, 2014).

Uma estimativa do impacto da esquistossomose demonstrou que mais de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo são afetadas pela doença (LI & WANG, 2017). Além disso, mais de 779 milhões de pessoas vivem em áreas de alta transmissão de esquistossomose, com 120 milhões de indivíduos apresentando sintomas relacionados à doença. Do total de pessoas infectadas, 93% vivem na África subsaariana e aproximadamente 76% vivem em áreas de alto risco de transmissão (RUJENI et al, 2017). Uma revisão do impacto da doença demonstrou que mais de 200.000 mortes por ano acontecem devido à esquistossomose na

África Subsaariana, sendo o ônus da doença seriamente subestimado (WHO, 2017). Desse modo é possível observar que esta doença ainda é um grande problema de saúde pública em várias partes do mundo, especialmente na África, onde vivem mais de 90% de todas as pessoas que necessitam de quimioterapia para esquistossomose (WHO, 2015).

Dos 78 países considerados endêmicos para esquistossomose, apenas 52 têm populações que são submetidas à quimioterapia preventiva. Desses, 118,5 milhões de crianças em idade escolar e 100,2 milhões de adultos necessitam de quimioterapia preventiva com o Praziquantel (PZQ). A Organização Mundial de Saúde (OMS) possui como meta o tratamento de 75% das crianças em idade escolar até 2020 (WHO, 2016). Os dados reportados para 2015 mostram que 66,5 milhões de indivíduos (53,2 milhões de crianças em idade escolar e 13,3 milhões de adultos) receberam quimioterapia preventiva para esquistossomose. Desse modo, a cobertura foi de 42,2% para crianças em idade escolar em 2015 (WHO, 2016).

O Brasil é o país das Américas mais afetado pela esquistossomose, com 42,9 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e aproximadamente 6,8 milhões de indivíduos infectados (SANTOS et al, 2017). No Brasil a esquistossomose é causada pelo *Schistosoma mansoni*, cujos hospedeiros intermediários são do gênero *Biomphalaria* (*Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata*). A transmissão da doença é extensa neste país, com áreas focais e endêmicas atingindo 19 dos 27 estados brasileiros. Além disso, as áreas mais afetadas (Figura 2) possuem características em comum, sendo elas: condições sanitárias precárias, pobreza e baixo nível educacional (MARTINS-MELO, 2014).

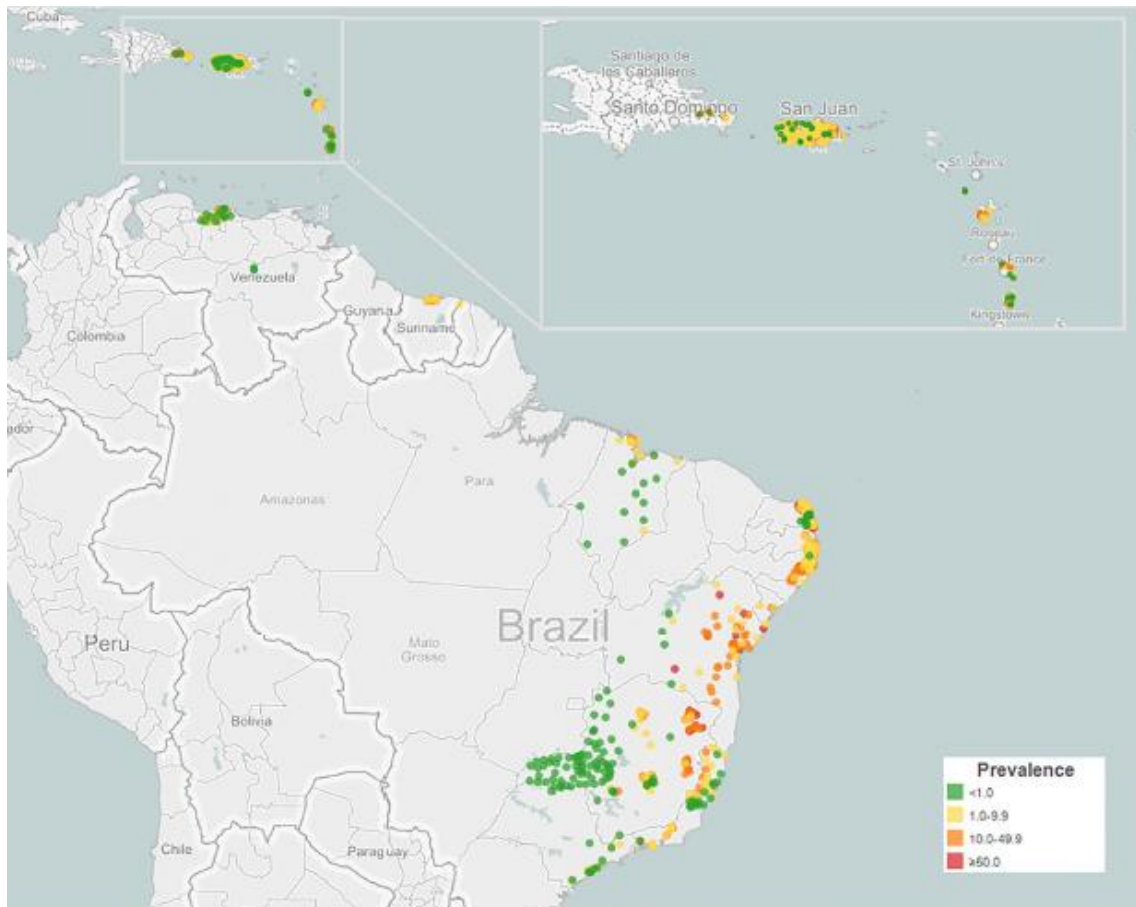


Figura 2: Faixa de positividade (%) da esquistossomose no Brasil e América Latina (ZONI et al, 2016).

Um estudo da ocorrência da esquistossomose no estado de Pernambuco, no ano de 2010, demonstrou que a doença foi considerada endêmica em 102 (55,2%) de seus 185 municípios, principalmente nas regiões da Zona da Mata e Metropolitana do Recife (BARRETO et al, 2015). Historicamente esta doença tem se caracterizado em Pernambuco como uma endemia rural, sendo o principal hospedeiro intermediário o *Biomphalaria straminea* (BARBOSA et al, 2014).

A migração de indivíduos infectados levou ao desenvolvimento da doença em locais como centros urbanos de cidades do interior e cidades costeiras do estado de Pernambuco. Isto ocorreu em grande parte devido ao processo de ocupação urbana desordenada nos arredores da cidade, o qual aliado à ausência de infraestrutura e de saneamento levou à manutenção de fontes de transmissão peridomésticas (GOMES et al, 2016).

Na figura 3 podem ser observados locais em Recife onde foram encontradas espécies do gênero *B. straminea*. Desse modo o conhecimento dos

fatores intrínsecos à doença, além das variáveis ambientais é importante para ações de prevenção e controle (SILVA, 2012).

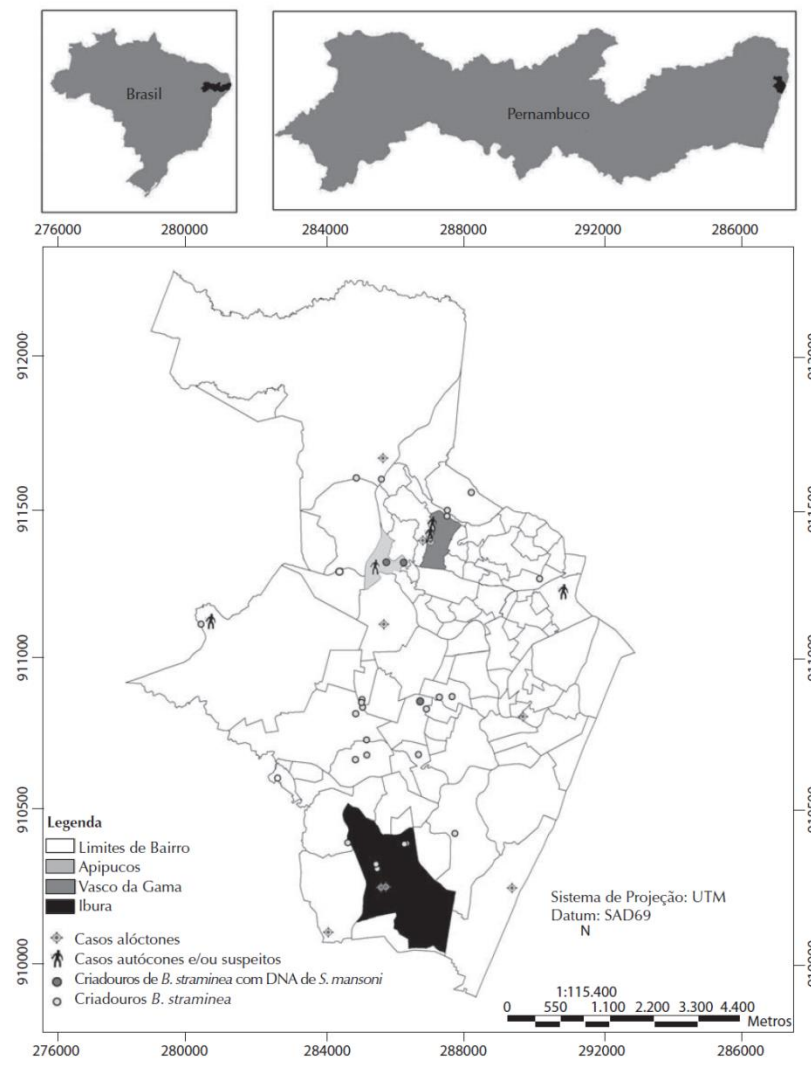


Figura 3: Distribuição geográfica dos casos de Esquistossomose e dos criadouros de *Biomphalaria* em Recife, 2012 (BARBOSA, 2013).

3.2 CICLO BIOLÓGICO DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes ao alcançar ambientes aquáticos eclodem quando submetidos a altas temperaturas e grande luminosidade, dando origem a miracídios, os quais são a forma ativa infectante do hospedeiro intermediário. Esta forma apresenta grande capacidade de locomoção devido à presença dos cílios, além de uma grande afinidade quimiotática aos moluscos. Após a penetração dos miracídios nos caramujos, o parasito sofre um processo de reprodução assexuada, através da formação de esporocistos primários e

secundários (figura 4), os quais darão origem à cercária, sendo esta a forma infectante do hospedeiro definitivo (OLIVEIRA et al, 2017; COLLEY et al, 2014).

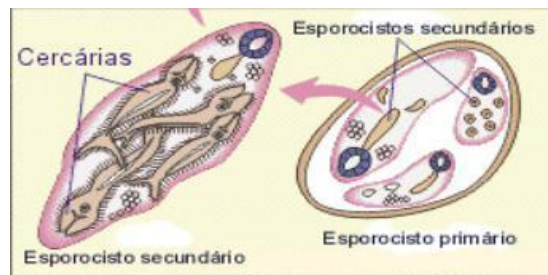


Figura 4: Reprodução assexuada nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, com formação de cercárias (Fonte: <http://www.geocities.ws/ceueterra/schistosomamansoni.htm>)

A cercária por sua vez nada ativamente no ambiente aquático onde acaba penetrando através da pele íntegra de animais e seres humanos, sendo estes últimos os hospedeiros definitivos (COLLEY et al, 2014). A penetração se dá por atividade mecânica e pela liberação de enzimas proteolíticas (CAROD-ARTAL, 2008).

No processo de penetração a cercária perde sua cauda, dando origem ao esquistossômulo, observado na figura 5. Os esquistossômulos migram através da circulação sanguínea e linfática, sendo levados passivamente até atingirem o coração e posteriormente os pulmões (EL RIDI et al, 2013). Após a penetração da cercária na pele humana, os esquistossômulos demoram de 5 a 7 semanas até tornarem-se vermes adultos capazes de liberar ovos (SANCHEZ et al, 2017).

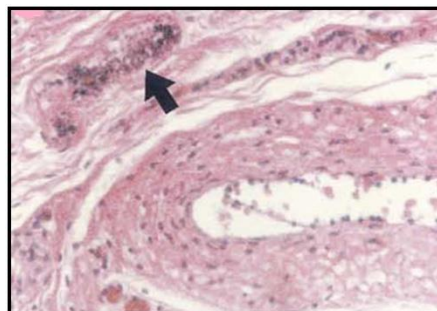


Figura 5: Corte histológico da pele. Esquistossômulo é identificado (seta) próximo ao vaso sanguíneo após 72 h de infecção. Corte corado com H&E, aumento 100x. (Fonte: <http://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/ciclo-biologico/>).

Os esquistossômulos permanecem no interior dos capilares pulmonares de 3 a 16 dias, onde após esse período acabam se deslocando para o coração e

consequentemente para a circulação sistêmica. Ao alcançarem o fígado, passam a alimentar-se e reproduzir-se continuamente. Após atingirem a maturidade, 28 a 35 dias pós-infecção, os vermes adultos então migram acasalados para os vasos portais mesentéricos onde passarão a liberar grandes quantidades de ovos diariamente. Os ovos, ao atravessarem as veias sanguíneas e caírem na luz intestinal, acabam sendo liberados juntamente com as fezes do indivíduo podendo reiniciar o ciclo (figura 6) (EL RIDI et al, 2013).

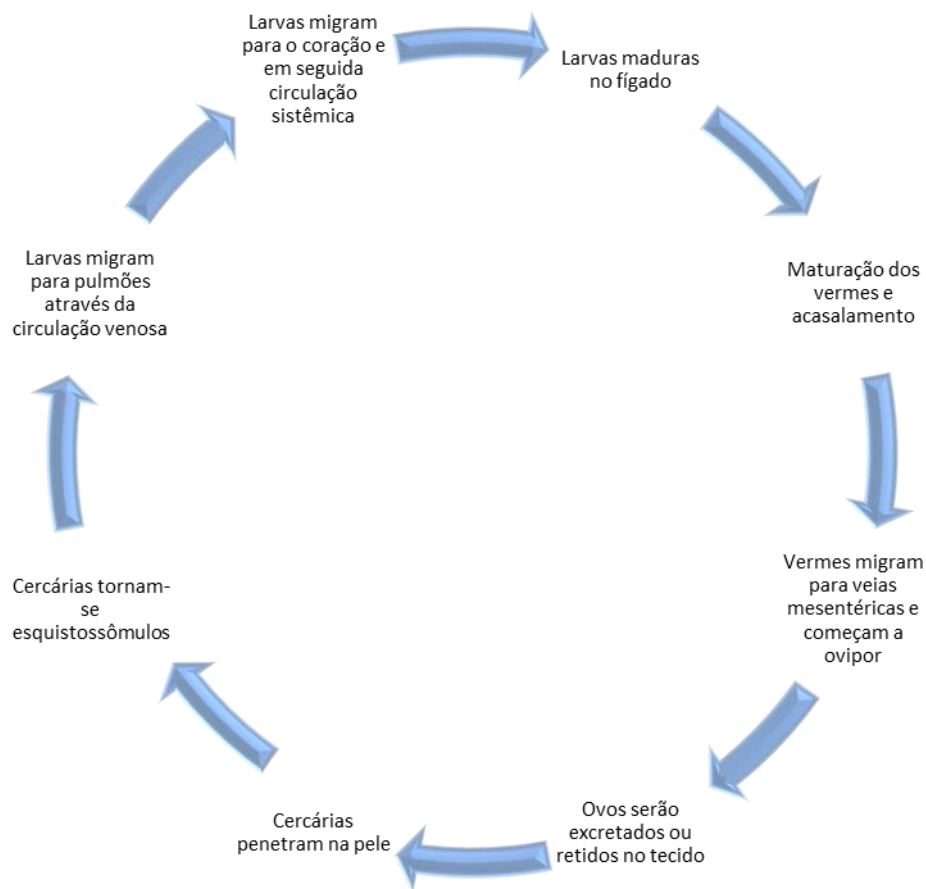


Figura 6: Ciclo biológico de vermes do *Schistosoma mansoni* (Elaboração própria).

3.3 PATOGENIA

A resposta imune desencadeada pela presença da infecção por *Schistosoma mansoni* tem sido uma importante área de investigação, uma vez que tem possibilitado compreender o desenvolvimento da patologia da esquistossomose (CORRÊA-OLIVEIRA et al, 2000).

Antígenos solúveis provenientes dos ovos são capazes de dar origem à formação de reações granulomatosas envolvendo células T, macrófagos e eosinófilos, os quais levam a uma série de sintomas e posteriormente a complicações. Os sinais e sintomas dependerão da quantidade e localização dos ovos, além de fatores relacionados ao próprio hospedeiro como idade, sexo, fatores genéticos e resposta imune (SHAKER et al, 2014; PEREIRA et al, 2010).

A fase aguda é caracterizada por sintomas como febre, dor abdominal, perda de peso, eosinofilia, cefaléia, anorexia e com menor frequência diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca, podendo durar um total de 2 a 10 semanas após a infecção (BECK et al, 2008; PORDEUS et al, 2008; CHEN et al, 2015). Por outro lado, a dermatite cercariana também pode estar presente nesta fase, ocorrendo após a penetração das cercárias no hospedeiro. Seus sintomas são caracterizados por erupção papular, eritema, edema e prurido, que podem durar até cinco dias após a infecção (PORDEUS et al, 2008).

Em indivíduos que não foram tratados na fase aguda, a doença pode evoluir para a fase crônica, com sinais de progressão para diversos órgãos e com níveis extremos de gravidade (BRASIL, 2007). A esquistossomose mansônica começa a se cronificar a partir dos 6 meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos e acabar apresentando a forma intestinal ou hepatoesplênica (PORDEUS et al, 2008).

Na esquistossomose crônica intestinal, os ovos que não foram eliminados acabam sendo depositados nos tecidos levando à formação do granuloma, que por sua vez pode provocar colite esquistossomótica aguda e posteriormente crônica, além da formação de pólipos intestinais. Manifestações clínicas incluem: dor abdominal intermitente, presença de sangue nas fezes, anemia por deficiência de ferro e eosinofilia (COLLEY et al, 2014).

A esquistossomose hepatoesplênica por sua vez está associada com a resposta imune do hospedeiro (OLVEDA et al, 2014). A princípio, os antígenos provenientes dos ovos induzem a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- α) a partir de células epiteliais e macrófagos, formando uma reação inflamatória granulomatosa macrófago-dependente (OLIVEIRA et al, 2017).

Em nível sistêmico forma-se primeiramente uma resposta imune Th1, frequentemente observada na fase aguda da doença, havendo a contínua produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocinas como IL-1 e IL-6. Com o passar do tempo, os antígenos originários dos ovos provocarão uma forte resposta

imunológica Th2, característica da forma crônica persistente, a qual substituirá a resposta Th1 levando à formação de granulomas. A principal citocina responsável pela fibrose na resposta Th2 é a IL-13, enquanto mediadores como IL-12, TNF- α , NO e Interferon gama (INF- γ) são responsáveis pela prevenção da produção excessiva de IL-13 (OLIVEIRA et al, 2017; SANTIAGO et al, 2014).

Por outro lado citocinas induzidas pela presença do parasito, como o IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , podem estimular a expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) em hospedeiros infectados. A atividade desta enzima resulta em prolongada produção de altos níveis de óxido nítrico (NO) (BRUNET, 2001). A importância do Óxido Nítrico está no seu efeito antiparasitário, o qual é exercido através da modificação química da cisteína protease, um alvo molecular responsável por vários aspectos do ciclo de vida do parasito e da relação hospedeiro-parasito (ASCENZI et al, 2003).

Os sintomas gerais da doença crônica incluem: diarreia crônica, dor abdominal, hepatomegalia e esplenomegalia. Aspectos clínicos característicos incluem: febre alta, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, eosinofilia e disenteria (Figura 7) (CHEN et al, 2015).



Figura 7: Paciente de 12 anos antes e após esplenectomia (OLVEDA et al, 2014).

Ao mesmo tempo os ovos do parasito que não foram eliminados podem acabar se disseminando no fígado e intestino, onde são capazes de obstruir veias capilares pré-sinusoidais. Nos espaços perisinusoidais do fígado, há desenvolvimento de inflamação e formação de granulomas periovulares, além de lesão tecidual. Desse modo, um desequilíbrio entre cicatrização e regeneração pode

acabar provocando um acúmulo de matriz extracelular rica em colágeno, levando à formação da fibrose hepática (Figura 8) (MASI et al, 2015).



Figura 8: Esquistossomose hepática. Fígado com fibrose periportal (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/pecasdc13.html>)

Ao longo do tempo, estudos clínicos relacionados com a taxa de morbidade resultante da esquistossomose apenas focaram em formas avançadas de complicações da doença como a hepatoesplenomegalia, fibrose periportal, hipertensão portal e dor abdominal. No entanto, as morbidades sistêmicas associadas a problemas como anemia, desnutrição, diarreia, diminuição do crescimento e da cognição, também têm se destacado por serem resultantes da infecção por esquistossomose (ANDRADE et al, 2017).

3.4 TRATAMENTO

De acordo com Coelho e colaboradores (1988), a droga ideal contra o *Schistosoma mansoni* seria aquela que apresentasse ausência de efeitos colaterais ou toxicidade no ser humano, alta seletividade contra o *Schistosoma*, eficiência em dose única, capacidade de ser ativa contra todos os estágios do parasito no hospedeiro humano e baixo custo. No entanto, o tratamento medicamentoso da esquistossomose sempre foi limitado pela dificuldade em se descobrir quimioterápicos que exibissem essas características (SILVA et al, 2012).

A terapêutica contra a esquistossomose mansônica iniciou-se nos anos 1920, onde foram utilizados vários compostos antimoniais como o tartarato de potássio e antimônio, tartarato emético, o dimercaptosuccinato de sódio e antimônio

e o di-(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio e antimônio, conhecido como Estibofeno (SILVA et al, 2012).

Nos anos 1960 e 1970, houve tentativas de introduzir novos compostos antimoniais como o Astiban®, mas estes não foram aprovados em ensaios clínicos iniciais e consequentemente não se tornaram comercialmente disponíveis. A tentativa de introduzir a Glucosamina no mercado também não foi bem sucedida, visto que a mesma não possuía boa eficácia contra a esquistossomose (KATZ & COELHO, 2008).

Entre os anos 1940 e 1945, vários medicamentos foram descobertos. A Lucantona (Miracil D) (Figura 9) foi descoberta na Bayer por cientistas alemães, e apesar da vantagem de ser o primeiro fármaco esquistossomicida a ser administrado oralmente, foi excluído do mercado por apresentar efeitos colaterais (KATZ & COELHO, 2008). Outro fármaco denominado Hicantona (Etrenol®) (figura 9), foi retirado do mercado devido à formação de lesões no fígado de pacientes, as quais estariam associadas à sua utilização (KATZ & COELHO, 2008). Por fim o Niridazol (Ambilhar®) foi utilizado na terapêutica (figura 9), e apesar de provocar efeitos colaterais toleráveis em curto prazo, descobriu-se que era capaz de causar convulsões e alucinações em longo prazo (KATZ & COELHO, 2008).

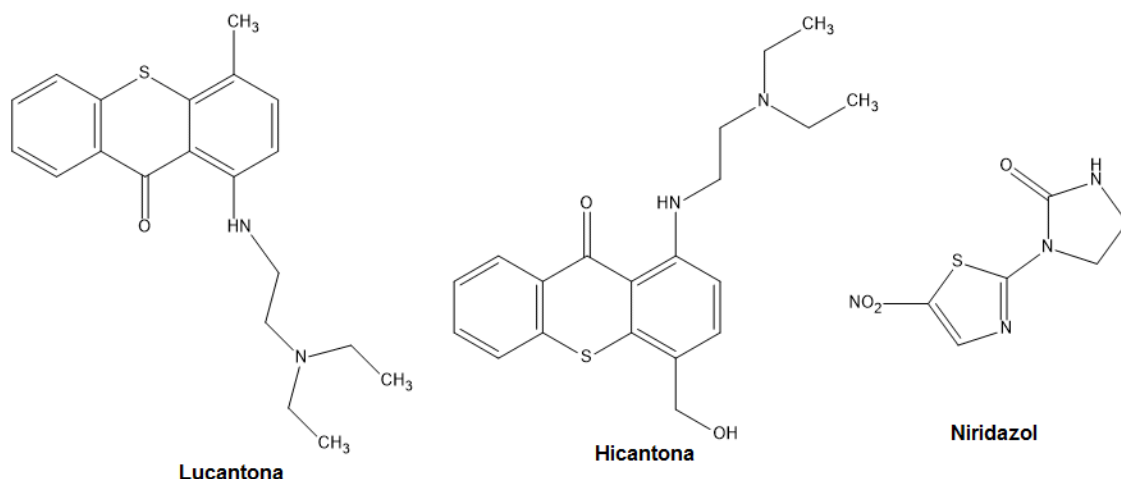


Figura 9: Estrutura dos medicamentos Lucantona, Hicantona e Niridazol.

Nos anos 1970, o Brasil estabeleceu um Programa de Controle Nacional da Esquistossomose (PCE), liderado pelo Ministério da Saúde. No início do Programa a

estratégia seria o controle da morbidade através da utilização da nova droga esquistossomicida denominada Oxamniquina (figura 10) (SCHOLTE et al, 2014).

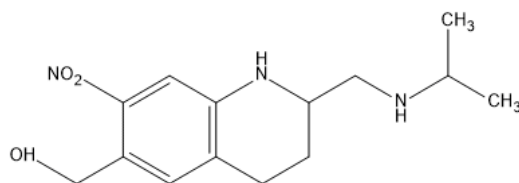


Figura 10: Oxamniquina

A Oxamniquina é um derivado quinolínico (2-aminometil-tetrahidro-quinolina), o qual é efetivo apenas contra as infecções provocadas pelo *Schistosoma mansoni* (BARSOUM et al, 2013). É ativa contra as formas intestinal e hepatoesplênica da infecção e foi lançada no Brasil pelos laboratórios Pfizer® sob o nome de Mansil®, para as formas farmacêuticas cápsulas e suspensão (SILVA et al, 2012).

Até 2003 mais de 12 milhões de tratamentos com Oxamniquina foram realizados. Desse modo o PCE obteve sucesso em reduzir a prevalência da esquistossomose, incluindo o número de casos de hepatoesplenomegalia. No entanto a utilização da Oxamniquina não foi capaz de prevenir novos surtos da doença (SCHOLTE et al, 2014). Além disso, foram reportados casos de resistência, onde vermes adultos eram capazes de sobreviver a doses de Oxamniquina cerca de 1.000 vezes maiores do que a dose efetiva (ABDUL-GHANI et al, 2009).

3.5 HISTÓRICO E RESISTÊNCIA AO PRAZIQUANTEL (PZQ)

Por volta de 1975, uma grande variedade de compostos foi utilizada contra a esquistossomose mansônica, apesar da presença de efeitos colaterais. Porém no fim da década de 70 e início da década de 80 o Praziquantel passou a substituir o medicamento Oxamniquine no tratamento de infecções por *S. mansoni*. Desse modo, o Praziquantel é um derivado pirazinoisoquinolínico utilizado contra infecções helmínticas há mais de 40 anos (BERGQUIST et al, 2017).

Desenvolvido por Merck & Bayer em 1970 na Alemanha, atualmente o Praziquantel é a única forma de tratamento largamente disponível tanto na África quanto nas Américas (SAVIOLI et al, 2017; FREZZA et al, 2013). Este fármaco possui segurança e baixo custo, além de uma atividade de amplo espectro,

características que tornaram o PZQ a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose (FAKAHANY et al, 2014). Sua estrutura química pode ser observada na figura 11.

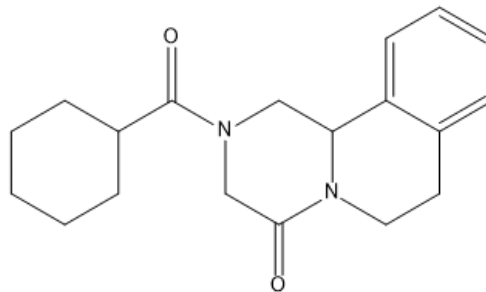


Figura 11: Praziquantel

A ação anti-helmíntica do Praziquantel deve-se provavelmente à inibição da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dos vermes, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a alguns cátions monovalentes e divalentes, especialmente ao cálcio, levando assim a uma intensa atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Desse modo, os vermes acabam se separando dos tecidos do hospedeiro, sendo então deslocados das veias mesentéricas para o fígado. No caso dos helmintos intestinais, estes são rapidamente expelidos (SILVA et al, 2012).

Com relação à eficácia, ao analisarmos o padrão de excreção de ovos após tratamento com o PZQ na dose de 40 mg/kg, os resultados mostram que há 60% a 90% de cura (ausência de ovos nas fezes), além de uma média de 80% a 95% de redução no número de ovos excretados em pacientes onde não houve cura. Com relação a questões de segurança, o PZQ pode ser considerado a droga antihelmíntica mais segura, podendo ser inclusive administrado a pacientes grávidas, uma vez que nesse caso os benefícios superariam os riscos (CIOLI et al, 2014).

Por outro lado, apesar do Praziquantel ser efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma*, o mesmo se apresenta ineficaz contra formas imaturas dos vermes. Por não serem eliminadas através do tratamento, as formas jovens acabam tornando-se maduras, dando início à liberação de ovos (SANCHEZ et al, 2017). Além disso, relatos de cepas resistentes têm preocupado as Organizações Mundiais de Saúde (NEVES et al, 2011).

Por outro lado o PZQ não previne a reinfecção, o que traz como consequência a necessidade de tratamentos sucessivos em áreas endêmicas (PEREIRA et al, 2015). Isso ocorre porque a administração do PZQ é normalmente limitada a uma única dose por ano, desse modo os pacientes tratados poderão ser rapidamente reinfetados devido à exposição contínua e inevitável ao parasito (SANCHEZ et al, 2017).

A resistência ao PZQ está emergindo em diversas áreas, ao passo em que não existem outros medicamentos esquistossomicidas com eficácia comparável. Por ser uma infecção com potencial risco de vida, além de apresentar manifestações graves no sistema hepatoesplênico e no trato gastrointestinal, há necessidade de desenvolvimento de novas drogas alternativas para o tratamento da esquistossomose (LORSUWANNARAT et al, 2013).

Apesar de existirem muitas pesquisas envolvendo antígenos dos vermes, ainda não existem vacinas contra a esquistossomose. Desse modo, a quimioterapia ainda é a única forma de controle desta doença (KHAN et al, 2016; SANCHEZ et al, 2017; AIRES et al, 2014; NAWARATNA et al, 2015).

3.6 NOVOS ALVOS BIOLÓGICOS NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

3.6.1 Via de Síntese das Purinas

A Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) é uma enzima da via de salvamento das Purinas capaz de catalisar a quebra da ligação glicosídica de ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos na presença de ortofosfatos inorgânicos (Pi), gerando a correspondente base de purina e ribose (MORAES et al, 2013). Esta enzima tem sido considerada um alvo primário na intervenção quimioterápica desde 1975, o que estimulou o desenvolvimento de estudos envolvendo inibidores da PNP como potenciais agentes terapêuticos (PEREIRA et al, 2005).

A PNP tem sido estudada como alvo para o tratamento de vários tipos de câncer, além de doenças crônicas e autoimunes. Porém mais recentemente, a PNP tem sido alvo de pesquisas no tratamento de doenças infecciosas parasitárias como Malária e Esquistossomose (CASTILHO et al, 2010).

Foi demonstrado que ao contrário dos seus hospedeiros mamíferos, o *Schistosoma mansoni* não é capaz de sintetizar nucleosídeos de purina através da via de novo, dependendo exclusivamente da via de salvamento para suprir suas necessidades de purinas. Desse modo, o componente enzimático da via das Purinas poderia representar um alvo em potencial para novas drogas esquistossomicidas, uma vez que a utilização de inibidores seletivos da PNP causaria esgotamento das reservas de purinas levando à morte do parasito (ANGELUCCI et al, 2011; SILVEIRA et al, 2004).

3.6.2 Tiorredoxina Glutationa Redutase

Os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* vivem em um ambiente aeróbico, sendo expostos continuamente ao stress oxidativo nas veias do seu hospedeiro final devido à presença de espécies reativas do oxigênio (ROS). No entanto, antioxidantes produzidos pelo parasito podem ajudar a remover as ROS, aumentando o tempo de sobrevivência dos vermes na circulação sanguínea (HAN et al, 2014).

Estudos demonstraram que existem diferenças significativas entre o mecanismo redox desses parasitos e seus hospedeiros humanos, sendo as defesas contra o stress oxidativo do *Schistosoma mansoni* bem menores comparados às defesas de seres humanos (LI et al, 2015).

Nos organismos eucariotas existem duas vias redox: Glutarredoxina (Grx) e Tiorredoxina (Trx). A Tiorredoxina Glutationa Redutase (TGR) é uma oxirredutase a qual exhibe especificidade para ambos os sistemas redox, devido à fusão entre os domínios da Glutarredoxina (Grx) e Tiorredoxina redutase (Trx) (SHARMA et al, 2009).

Uma enzima similar foi encontrada no *Schistosoma mansoni*, a SmTGR. O sistema antioxidante do *Schistosoma* não dispõe das enzimas Tiorredoxina Redutase (TR) e Glutationa Redutase (GR), funcionais no hospedeiro humano, sendo essas enzimas completamente substituídas pela SmTGR. Esta peculiaridade revelou que a SmTGR poderá constituir portanto um importante alvo para drogas utilizadas no tratamento da esquistossomose (SHARMA et al, 2009).

3.6.3 Proteínas quinases

Proteínas quinases (PKAs) são enzimas transdutoras de sinais que poderiam ser utilizadas como alvos terapêuticos na descoberta de novas drogas esquistossomicidas, uma vez que estudos demonstraram que inibidores das PKAs apresentaram aplicações antiparasitárias (SWIERCZEWSKI & DAVIES, 2010).

As proteínas quinases dependentes do AMP_c (PKAs) são as maiores mediadoras da sinalização do AMP_c em organismos eucarióticos, além de possuir um papel central em processos biológicos. Em um experimento, a perda da PKA influenciou negativamente a produção de ovos, além de ter sido letal para os vermes adultos *in vitro*, enquanto a ativação da PKA estimulou o movimento neuromuscular (DOERIG & GREVELDING, 2015; SWIERCZEWSKI & DAVIES, 2010).

Por outro lado, entre as proteínas quinases citoplasmáticas bem caracterizadas no *Schistosoma mansoni* está a quinase “*polo-like*” SmPlk1. A Dihidropteridinona (BI2536), originalmente uma droga antineoplásica em humanos, demonstrou ser um inibidor potente e seletivo da Plk1 provocando profundas alterações nas gônadas do parasito, incluindo a redução de gametas imaturos (oogonia e espermatogonia) e uma diminuição do número de espermatozóides totalmente diferenciados *in vitro* (DOERIG & GREVELDING, 2015).

Long e colaboradores (2010) também demonstraram que a SmPlk1 é abundantemente expressa nas células germinadas e vitelinas de vermes adultos, além de serem capazes de iniciar e regular a transição G2/M do ciclo celular. Como a inibição de SmPlk1 é capaz de alterar morfológicamente os órgãos reprodutores do *Schistosoma mansoni*, essa proteína quinase passa a possuir uma grande importância como novo alvo biológico para drogas esquistossomicidas.

3.6.4 Sistema Neuromuscular

Uma área que tem sido especialmente produtiva na busca de novos alvos terapêuticos é o sistema nervoso do *Schistosoma mansoni*, uma vez que este é responsável por uma variedade de processos que são essenciais para a

sobrevivência do parasito, como: migração, adesão, alimentação e reprodução (MACDONALD et al, 2015).

Os circuitos neuronais que controlam a função muscular e o movimento são de particular interesse como alvo biológico de novas drogas esquistossomicidas, uma vez que os vermes utilizam seu sistema neuromuscular para o controle dos músculos de ventosas, do músculo de revestimento das vísceras, incluindo os tratos digestivo, reprodutivo e excretor, além da cópula entre machos e fêmeas. Por constituírem atividades essenciais à sobrevivência dos parasitos, uma droga capaz de inibir uma ou várias dessas atividades interferiria com o ciclo de vida normal do verme, e eventualmente causaria a eliminação do parasito do organismo hospedeiro (RIBEIRO & PATOCKA, 2013).

Estudos envolvendo o sistema colinérgico como alvo antihelmíntico têm sido realizados com sucesso, havendo o estabelecimento de uma relação causal entre a ativação de receptores nicotínicos em fibras musculares de *S. mansoni* e a paralisia flácida causada pela AChE em vermes. Drogas antinematódeas comuns como Levamisol, Pirantel e Monepantel, além da droga esquistossomicida Metrifonato mostraram ser capazes de interromper a sinalização neuromuscular através da interação com proteínas pertencentes ao sistema colinérgico dos vermes (MACDONALD et al, 2014).

Pesquisas anteriores demonstraram que a esquistossomose poderia ser tratada com a droga Metrifonato, uma vez que esta seria capaz de interromper o sistema colinérgico e a sinalização neuromuscular interagindo com a Acetilcolinesterase (AChE) do *Schistosoma mansoni*. No entanto, o Metrifonato foi retirado do mercado devido a níveis de toxicidade inaceitáveis ao hospedeiro, além da ocorrência de variação da sua eficácia contra diferentes espécies de *Schistosoma* (YOU et al, 2016). Apesar disso, a AChE do *Schistosoma mansoni* é considerada uma proteína funcional que pode ser útil para propósitos de diagnóstico, desenvolvimento de vacinas e design de novas drogas (ARNON et al, 1999).

3.6.5 DNA Topoisomerase

Em todas as células, a DNA topoisomerase tem um papel central na transcrição, replicação e reparo do DNA, além de divisão celular em geral. A

obrigatoriedade da presença de topoisomerases para o funcionamento celular tem sido explorada para o tratamento de infecções bacterianas e câncer. As topoisomerases são amplamente classificadas como tipo I ou tipo II baseando-se no seu modo de ação no DNA (MUDEPPA et al, 2015).

Uma estratégia utilizada para determinar o valor terapêutico de genes em parasitos, particularmente helmintos, é a interferência no RNA (MACDONALD et al, 2014). Compostos acridínicos possuem a capacidade de se intercalar a moléculas de DNA e inibir as enzimas topoisomerases I e II responsáveis pelo processo de replicação celular (YANG et al., 2006). A acridina (10-2-(dietilamino)etil-9-acridanona(2-tiazolin-2-il)hidrazona) (Figura 12), apresentou efeito esquistossomicida em camundongos infectados com *S. mansoni*, causando uma diminuição do teor de proteínas devido à redução da quantidade de RNAm no parasito. Esses acontecimentos acabaram levando à morte dos parasitos (COELHO et al, 1995; ESHETE & BENNETT, 1990).

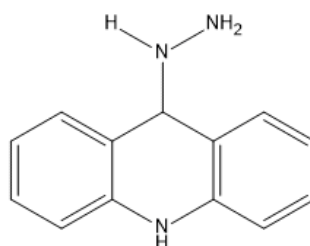


Figura 12: 9-acridanona-hidrazona.

Desse modo a DNA topoisomerase também pode contribuir como um possível alvo biológico para drogas esquistossomicidas (ABDUL-GHANI et al, 2009).

3.6.6 Cisteína Proteases

As cisteína proteases estão entre os alvos biológicos mais estudados e explorados em doenças parasitárias, uma vez que possuem um papel essencial na nutrição do parasito, na evasão imunológica, na invasão dos tecidos do hospedeiro, e na metaciclogênese. Moléculas de tiossemicarbazonas e derivados heterocíclicos contendo um núcleo tiazól demonstraram inibir cisteína proteases, levando à obtenção de resultados promissores (FONSECA et al, 2015).

Os vermes adultos de *S. mansoni* expressam diferentes classes de cisteína peptidases. A Catepsina B1 do *Schistosoma mansoni* (SmCB1), um membro das cisteína peptidases lisossômicas da superfamília Papaína, é expressa em altos níveis no ceco e protonefrídia de cercárias. A expressão aumenta no intestino do parasito logo após a penetração na pele e transformação em esquistossômulo, correspondendo ao período de início da alimentação do sangue do hospedeiro (EL RIDI et al, 2013; JILKOVÁ et al, 2014).

Dado seu papel central na biologia do *Schistosoma mansoni*, há um grande interesse na utilização das cisteína proteases tanto como candidatas a vacinas na profilaxia da doença, quanto como potencial alvo terapêutico no tratamento da esquistossomose (EL RIDI et al, 2013).

3.6.7 Canais de Cálcio

Vários estudos têm demonstrado que os canais de Ca^{+2} regulados por voltagem são candidatos a alvos terapêuticos na quimioterapia contra a esquistossomose, uma vez que possuem um papel crítico na regulação do Ca^{+2} intracelular, além de serem essenciais para uma variedade de eventos celulares do parasito, incluindo contração, expressão de genes e liberação de neurotransmissores (SILVA-MORAES et al, 2013).

O possível envolvimento dos canais de Ca^{+2} na atividade esquistossomicida pode ser observado quando, após exposição ao Praziquantel, o *Schistosoma mansoni* recebe um grande influxo de Ca^{+2} levando a uma contração muscular intensa e constante, além de rompimento do tegumento do parasito e morte (SILVA-MORAES et al, 2013).

A contração muscular do *Schistosoma mansoni* é essencial para a sobrevivência do verme. Existe evidência de que os canais de cálcio regulados por voltagem apresentam um papel fundamental na função muscular somática em vermes de *S. mansoni* e em outros parasitos (MENDONÇA-SILVA et al, 2006).

Desse modo, a modulação farmacológica ou genética da atividade dos canais de Ca^{+2} na membrana plasmática ou nas organelas intracelulares deverá possuir um profundo impacto na função celular e na sobrevivência de parasitos como o *Schistosoma mansoni*. Isso sugere que os canais de Ca^{+2} podem

representar novos alvos terapêuticos no tratamento contra a esquistossomose (PROLE & TAYLOR, 2011).

3.6.8 PPAR- γ

Os receptores proliferadores ativados do peroxissoma (PPARs) são uma família de fatores de transcrição nuclear ativados por ligantes, membros da superfamília de receptores hormonais nucleares. Existem três subtipos de PPAR identificados, sendo eles PPAR- α , PPAR- β e PPAR- γ , no entanto apenas o PPAR- γ está expresso nas células estreladas hepáticas humanas (CEH), contribuindo para o processo de fibrogênese no fígado (CHEN et al, 2008).

A fibrose periportal é considerada uma grave consequência da infecção pela esquistossomose, e envolve a remodelação da matriz extracelular e a deposição de colágeno, especialmente pelas células estreladas hepáticas. Harza e colaboradores (2004) demonstraram que a depleção do PPAR- γ estava associada com a ativação das CEH, enquanto que o aumento da expressão do PPAR- γ estava relacionado com a inibição das CEH. Ao mesmo tempo foi descoberto que os receptores PPAR- γ possuíam atividade anti-proliferativa e anti-fibrótica em CEH ativadas, bem como eram capazes de induzir a apoptose das CEH (ATTIA et al, 2013).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2015) as tiazolidinas (TZDs) são agonistas do receptor gama proliferador ativado do peroxissoma (PPAR- γ) e estão envolvidas na redução da fibrose hepática em indivíduos acometidos pela fase crônica da esquistossomose mansônica. Desse modo, o PPAR- γ é um alvo terapêutico de extrema importância, uma vez que pode controlar complicações provenientes da esquistossomose.

3.7 PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS

O composto K11777 (figura 13), um inibidor da cisteína protease, apresentou uma potente atividade esquistossomicida capaz de promover a cura parasitológica e de retardar as complicações relacionadas com a deposição de ovos nos órgãos do hospedeiro, quando administrada no início da infecção. Por outro lado quando administrada durante a infecção, foi capaz de reduzir significativamente tanto a

carga parasitária quanto os processos patológicos associados à doença (ABDULLA et al, 2007).

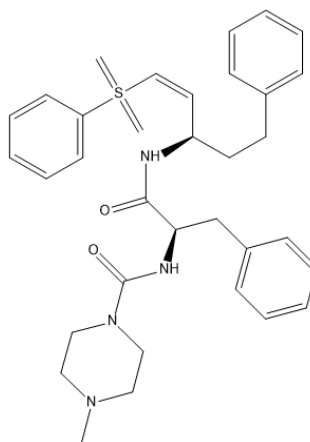
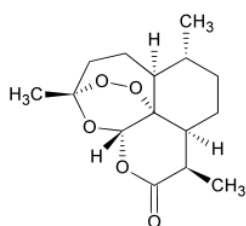
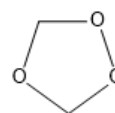


Figura 13: Estrutura química da vinil sulfona K11777 (N-metil-piperazina ureia-fenilalanil-homofenilalanil vinil sulfona-fenil).

Xiao e colaboradores (2007) demonstraram que vários derivados trioxolanos que possuíam o grupo farmacofórico endoperóxido da Artemisina, apresentaram atividade contras as formas jovens e adultas do *Schistosoma mansoni* e do *Schistosoma japonicum* em hamsters, algo vantajoso em relação à Artemisina, uma vez que esta tem limitações terapêuticas. Foi observada uma redução de 80% da carga parasitária em hamsters após a administração do OZ78. Os autores também demonstraram que o OZ78 possuía uma biodisponibilidade oral bem maior (74%) do que a observada após a administração da Artemisina (1,4%) em ratos (Figura 14). Desse modo os trioxolanos podem ser especialmente vantajosos em áreas onde a Malária e a Esquistossomose são coendêmicas.



Artemisina



1,2,4-trioxolano (OZ78)

Figura 14: Comparação entre a estrutura da Artemisina e do OZ78.

Sayed e colaboradores (2008) identificaram o oxadiazol 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-carbonitrila-2-óxido (figura 15) como um composto eficaz na quimioterapia contra a esquistossomose. Sua atividade depende da doação do Óxido Nítrico (NO), o que levaria à inibição da atividade da tioredoxina-glutationa redutase (TGR) no

parasito. Além disso, os autores observaram que este composto apresentou baixa citotoxicidade, alta bioatividade e tolerância durante os experimentos, tornando-se um composto um potencial candidato a nova droga esquistossomicida.

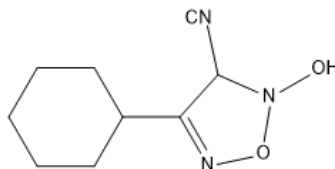


Figura 15: Estrutura do 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-carbonitrila-2-óxido

Hoffman-La Roche desenvolveram o Ro15-5458, um derivado do grupo químico 9-acridino-hidrazona, o qual demonstrou possuir atividade esquistossomicida a baixas doses, além de baixos títulos de anticorpos contra os ovos do parasito. Além disso, o Ro15-5458 também foi ativo contra esquistossômulos em camundongos infectados, sendo esta a sua vantagem em relação ao Praziquantel (ABDUL-GHANI et al, 2009).

Pesquisas demonstraram que outro derivado denominado Ro 11-3128 é altamente eficaz contra o *S.mansoni*, possuindo eficácia similar ao Niridazol, Hicantone e Oxamniquine. Além disso, em baixas concentrações o Ro 11-3128 é capaz de produzir paralisia espástica de machos adultos de *Schistosoma mansoni*, similarmente ao que acontece no mecanismo de ação do Praziquantel (ABDUL-GHANI et al, 2009).

Neves e colaboradores (2011) demonstraram que o derivado 1-benzil-4-[(4-cloro-fenil)-hidrazona]-5-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT-05) foi capaz de apresentar atividade esquistossomicida *in vitro* significativa, causando 100% de mortalidade em um período de 24 horas (Figura 16). Além disso, estes derivados foram capazes de produzir alterações ultraestruturais nos vermes.

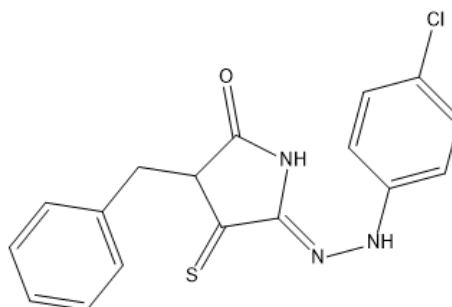


Figura 16: Estrutura química do LPSF/PT-05

Silva e colaboradores (2012) relataram que o 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ-04) apresentou importante atividade esquistossomicida *in vitro* (Figura 17). O protótipo utilizado na construção da estrutura química do LPSF/FZ-04 foi o Niridazol, um medicamento utilizado anteriormente na quimioterapia da esquistossomose. A desvantagem do LPSF/FZ-04 consiste em uma baixa taxa de dissolução e baixa solubilidade aquosa, o que faz com que haja dificuldade na sua absorção e reprodutibilidade em ensaios biológicos.

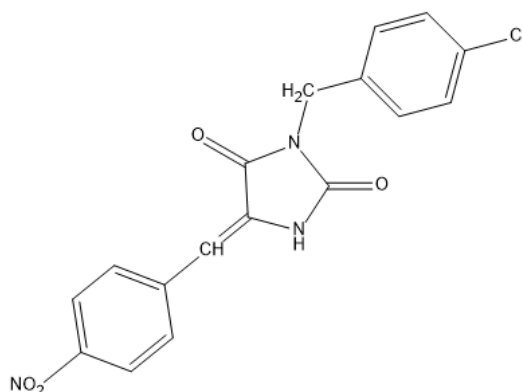


Figura 17: Estrutura do LPSF/FZ-04

Mais recentemente, a droga antimalárica Mefloquina (Mef) (figura 18) apresentou atividades tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra a maioria das espécies de *Schistosoma*. Além de possuir efeitos esquistossomicidas e ovicidas, a Mefloquina também possui atividade antioxidante no hospedeiro. O efeito antioxidante pode ser explicado pela estimulação de enzimas antioxidantes ou pela inibição da peroxidação lipídica no parasito (FAHMY et al, 2014).

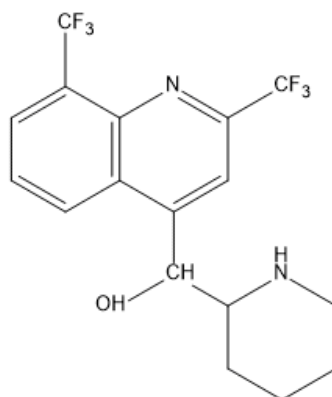


Figura 18: Mefloquina

Desse modo a Mefloquina possui duas vantagens em relação ao Praziquantel. A primeira vantagem trata-se de uma redução significativa da carga

parasitária, além de alterações do tegumento tanto em formas jovens quanto adultas do *Schistosoma mansoni*. A segunda vantagem diz respeito ao fato de que a Malária e a Esquistossomose coexistem em diversas regiões tropicais e subtropicais da África, desse modo a Mefloquina poderia ser utilizada no tratamento de ambas as doenças (FAKAHANY et al, 2014).

Gold e colaboradores (2017) realizaram um estudo envolvendo a Artemisona, a qual é superior em relação aos derivados da Artemisinina com relação a características farmacocinéticas e baixa toxicidade. A Artemisona foi administrada em testes *in vitro* e *in vivo* na forma de polímeros para permitir uma liberação lenta do fármaco. Os resultados demonstraram alta atividade esquistossomicida, com 73,1% e 95,9% de redução na quantidade de vermes na fase jovem e adulta, respectivamente. A grande importância da Artemisona neste contexto consistiu no tratamento de hospedeiros infectados com vermes jovens, antes mesmo da deposição de ovos, a qual está associada à indução de respostas imunológicas prejudiciais.

3.8 NÚCLEOS MOLECULARES UTILIZADOS NA FORMAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXÓIS (LQIT/NW)

3.8.1 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (figura 19) são compostos de grande interesse devido a suas propriedades químicas e atividades biológicas. Segundo a nomenclatura da IUPAC, são obtidas normalmente através da condensação de um aldeído ou cetona com uma tiossemicarbazida, e são nomeadas adicionando-se o nome da classe “tiossemicarbazona” após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (KHANDANI et al, 2013).

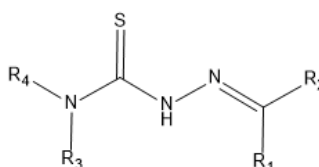


Figura 19: Estrutura básica da tiossemicarbazona.

Essa molécula apresenta como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua ampla aplicação como intermediário de muitos núcleos importantes. Além disso, apresenta baixo custo de síntese e grande economia de átomos, uma vez que com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (TENORIO et al, 2005; CASTIÑEIRAS et al, 2014).

As tiossemicarbazonas constituem um grupo de ligantes de grande interesse devido ao seu caráter doador e ao seu comportamento de coordenação. Estes compostos tornaram-se objeto de intensa pesquisa desde a descoberta de sua atividade citotóxica contra células cancerígenas, além de seus efeitos bacteriostáticos. As propriedades biológicas das tiossemicarbazonas são frequentemente elevadas pela coordenação com metais iônicos aumentando, por exemplo, a lipofilicidade (KHANDANI et al, 2013).

Os benefícios biológicos dessa classe de complexos incluem atividade antibacteriana, antimalárica, antiviral, além de antitumoral. Com relação à atividade antitumoral, revelou-se que as tiossemicarbazonas seriam potentes agentes antineoplásicos capazes de inibir a enzima Topoisomerase II (QIN et al, 2012; BABAHAN et al, 2014). Além disso, Akgemci e colaboradores (2015) relataram que as tiossemicarbazonas também possuem atividade anti-tuberculosa, anti-HIV, anti-tripanosoma, anti-amebiana e anti-convulsivante (BERALDO & GAMBINI et al, 2004).

Como falado anteriormente, as atividades biológicas das tiossemicarbazonas estão relacionadas com a interação com metais iônicos. No entanto, uma série de mecanismos de ação já foram identificados, incluindo a inibição da enzima Ribonucleotídeo Redutase (RNR), danos radicais dependentes de metais (espécies reativas de oxigênio), ligação ao DNA, inibição da Topoisomerase II, interrupção do funcionamento das mitocôndrias, inibição da síntese de proteínas, e mais recentemente inibição de proteínas multiresistentes a drogas (MOORTHY et al, 2013).

Entre os alvos biológicos mais explorados para doenças negligenciadas, estão as cisteína proteases. Estas enzimas estão relacionadas com a nutrição do

parasito, evasão do sistema imune e invasão das células do hospedeiro. Greembaum e colaboradores sintetizaram e avaliaram uma grande coleção de tiossemicarbazonas com atividade antiparasitária e inibidora da cisteína protease, sendo seus resultados bastante promissores (FONSECA et al, 2015).

Além disso, Espindola e colaboradores (2015) realizaram testes com análogos das tiossemicarbazonas, os quais foram capazes de inibir a Cruzaína, uma protease pertencente à família de cisteína proteases e que tem papel fundamental na invasão, diferenciação e proliferação de parasitos em células do hospedeiro.

3.8.2 Tiazolidinonas

Por diversas vezes tem sido provada a importância dos heterocíclicos, principalmente no que se refere a sua utilidade na formação de medicamentos. Os heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros contendo um ou mais átomos de nitrogênio, pertencem à classe de substâncias denominada de azol (MELO, 2006).

O tiazol é formado por um anel de cinco membros, sendo que dois destes são heteroátomos (Figura 20) (SANTIAGO, 2014).

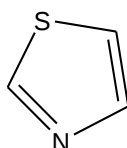


Figura 20: Tiazóis - compostos contendo 3 carbonos, 1 átomo de nitrogênio e 1 átomo de enxofre.

Os tiazóis têm sido bastante estudados e constituem uma parte importante de muitas moléculas biologicamente ativas. Ao longo dos anos foi notada a presença de várias atividades biológicas importantes dos derivados dos tiazóis (ZEVZIKOVIENE et al, 2012). Um exemplo disso é o seu análogo denominado 4-tiazolidinona (figura 21), o qual possui uma carbonila na posição quatro do anel tiazol (SANTIAGO, 2014).

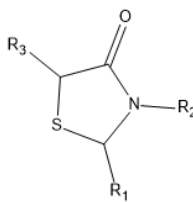


Figura 21: Estrutura química da 4-tiazolidinona.

A síntese de compostos contendo o anel 4-tiazolidinona é frequentemente descrita na literatura. No entanto ainda existem pesquisas no sentido de se encontrar um método simples, eficiente e de baixo custo para a obtenção destes compostos. Normalmente, as 4-tiazolidinonas são obtidas com bons rendimentos através de reações de ciclização envolvendo ácido-haloacético ou ácido α -mercaptoacético (LIESEN et al, 2008).

As atividades biológicas das 4-tiazolidinonas e seus derivados têm sido extensamente descritas na literatura, sendo elas anticonvulsivante, antituberculosa, antifúngica, anestésica, anti-HIV e antiinflamatória (SINGH et al, 1981; BEHBEHANI & IBRAHIM, 2012), anti-diabética, anti-aterosclerose (PERGAL et al., 2005), anti-fibrótica (KON et al., 2002), antiprotozoária (LIESEN et al., 2008).

Santiago e colaboradores (2014) demonstraram que, dentro de um grupo de 10 moléculas, compostos os quais possuíam como núcleo o tiazol e ftalimida provocaram uma significativa diminuição da motilidade, inibição do acasalamento e da oviposição. Estes compostos também obtiveram um índice de mortalidade de 100% após 144 h de exposição e estimularam a produção de óxido nítrico e do TNF- α , indicando a presença de atividade imunomodulatória. O composto LpQM-45 (Figura 22) causou significativa alteração ultraestrutural, com destruição do tegumento de vermes machos e fêmeas

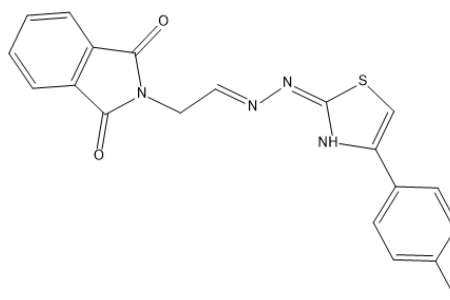


Figura 22: Estrutura química do Ftalil-tiazol LpQM-45.

3.8.3 1,3-Benzodioxol (Safrol)

O safrol (Figura 23) é um alilbenzeno natural de distribuição ampla no reino vegetal. É possível encontrá-lo em grandes quantidades em espécies das famílias *Aristolochiaceae*, *Lauraceae* e *Piperaceae*. Além disso, o safrol constitui o principal componente do óleo essencial de *Sassafrás albidum*, uma Laurácea encontrada na região oriental dos Estados Unidos. No entanto, é possível encontrá-lo também em outra espécie de Laurácea denominada *Ocotea pretiosa*, a qual está presente no vale do rio Itajaú-Açu, em Santa Catarina. O óleo de Sassafrás é produzido através do arraste a vapor do tronco e lenho da *Ocotea pretiosa*, e o teor de safrol presente neste caso é superior a 90% (COSTA, 2000).

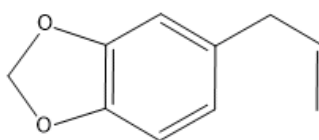


Figura 23: Estrutural química do Safrol.

O piperonal (Figura 24), um derivado do safrol, possui uma distribuição mais restrita e em menor quantidade no reino vegetal. No entanto, o mesmo pode ser obtido em síntese orgânica através da isomerização da dupla ligação do safrol, seguida por uma reação de oxidação. Desse modo, é possível estabelecer que o piperonal é um produto barato, acessível e disponível comercialmente (COSTA, 2000).

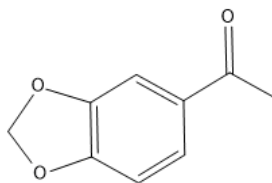


Figura 24: estrutura química do Piperonal.

O anel benzodioxol, o qual é um bioisóstero do benzodiazol, é estudado devido às suas atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antimalárica e antioxidante. Além disso, derivados do benzodioxol também são utilizados como pesticidas ou intermediários de pesticidas e herbicidas. O sistema

1,3-benzodioxol também pode estar presente em muitos produtos naturais como sesamol e piperonal (GUPTA et al, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 DERIVADOS BENZODIOXÓIS

Os derivados benzodioxóis foram sintetizados no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica/LqIT, do Departamento de Antibióticos – CCB/ UFPE, local onde também foram determinadas suas características físico-químicas. Todos os derivados benzodioxóis tiveram suas estruturas caracterizadas por meio do RMN¹H, RMN¹³C, IV e espectrometria de Massas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental – DQF/ UFPE.

4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* EM CÉLULAS HELA (*HUMAN CERVICAL CANCER*)

O ensaio de MTT baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que devem ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância (PEREIRA ET AL, 2004).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando células HeLa. Células na fase de crescimento exponencial foram coletadas por centrifugação e uma concentração de $4-5 \times 10^4$ /mL foi criada. Em seguida, 100 µL da suspensão celular foi adicionada a cada poço em uma placa de 96 poços. A cultura foi mantida overnight a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os derivados benzodioxóis foram adicionados a concentrações de 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12 µM. Cada concentração foi realizada em triplicata e foram utilizados poços contendo controle negativo (sem células e sem drogas). Os poços sem células apenas continham meio de cultura RPMI 1640, MTT, DMSO e derivados benzodioxóis. Os poços sem drogas continham células HeLa, meio RPMI 1640, MTT e DMSO. As células foram mantidas em cultura por 48 h a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Logo após, 20 µL de 5 mg/mL de MTT foi adicionado a cada poço e as condições de cultura foram mantidas por 4 h. Após esse ponto, o meio de cultura foi removido e 150 µL DMSO foi adicionado a cada poço para solubilizar qualquer cristalização. O valor da

absorbância a 570 nm de cada poço foi medido utilizando-se uma leitora de ELISA para determinar o efeito tóxico dos derivados benzodioxóis sobre as células (SONG ET AL, 2016).

4.3 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO PELO MÉTODO DE GRIESS

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida através da quantificação de nitrito (um produto estável do NO) acumulado em culturas de sobrenadantes de células HeLa estimuladas com os derivados benzodioxóis. As concentrações utilizadas foram 1000 μM , 200 μM , 100 μM e 50 μM . Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor e LPS (50 $\text{ng} \times \text{mL}^{-1}$) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

O método indireto de Griess foi utilizado, e os níveis de nitrito foram quantificados utilizando 50 μL de cada sobrenadante além de igual volume do reagente de Griess [1% de Sulfanilamida, 0.1% de dihidroclorato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, 2.5% H_3PO_4], e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida num espectrofotômetro a 540 nm (Multiskan FC; Thermo Scientific) e os níveis de nitrito em cada amostra foram determinados após 24 h e 48 h por extrapolação de uma curva padrão previamente determinada.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*

Os derivados benzodioxóis foram avaliados na concentração de 200 μM com a finalidade de verificar qual seria o potencial dos compostos para a atividade esquistossomicida (*screening*). As seguintes moléculas foram testadas: LqIT/NW-02, LqIT/NW-03, LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09, LqIT/NW-10, LqIT/NW-11, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14.

Os vermes adultos de *S. mansoni* expostos aos derivados benzodioxóis e ao PZQ (controle positivo) foram observados por um período de 5 dias (120 h) quanto aos seus movimentos, obedecendo aos critérios criados por Ramirez et al (2007), utilizando pontuações de 0 a 3 para cada movimento analisado.

- Pontuação 3: Vermes ativos, movimentos corporais normais do parasito;

- Pontuação 2: Vermes lentos, retardamento dos movimentos corporais, podendo apresentar apenas movimentos cefálicos do parasito;
- Pontuação 1: Vermes muito lentos, com movimentos ocasionais das suas extremidades;
- Pontuação 0: Vermes imóveis/mortos, ausência total dos movimentos corporal e cefálico do parasito.

Durante todos os experimentos, os seguintes parâmetros foram observados: motilidade, capacidade de pareamento dos vermes, aderência das ventosas à placa de cultura, capacidade de oviposição e lesão tegumentar.

Em seguida, os derivados que apresentaram os melhores resultados para a atividade esquistossomicida foram submetidos a um novo ensaio *in vitro*, o qual utilizou concentrações que variaram de 200 a 25 µM.

4.4.1 Animais

Camundongos fêmeas Swiss webster (*Mus musculus*) com 30 dias de idade, pesando cerca de 30g (± 2 g) foram fornecidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) de acordo com condições padronizadas de temperatura (23°C), umidade (entre 40 e 50%) e fotoperíodo (12h de luz/escuro) com água e ração (LABINA®) *ad libitum*.

4.4.2 Infecção por *Schistosoma mansoni*

Todos os procedimentos foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FIOCRUZ) nº processo 23076.046642/2014-81. Aos 45 dias de idade, os animais foram infectados por via percutânea, utilizando cerca de 120 cercárias de *S. mansoni* (Cepa BH), oriundas de *Biomphalaria glabrata*, para cada animal. Após 42 dias, a infecção foi confirmada através de exame parasitológico das fezes dos camundongos utilizando o método HOFFMAN, PONS & JANER, 1934.

4.4.3 Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram submetidos à eutanásia após 45 dias de infecção. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina

(100-200 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg). Após anestesia, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático para a recuperação dos vermes (DUVAL & DEWITT, 1967).

4.4.4 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados benzodioxóis

Após a perfusão, os vermes recuperados foram lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro bovino fetal a 10 %. Após a lavagem, 4 vermes (2 casais) foram transferidos para placas de cultura contendo 2 mL de meio RPMI-1640 completo e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados benzodioxóis foram adicionados nas concentrações de 200 µM, 100 µM, 50 µM e 25 µM dissolvidos em 1,5% de DMSO. O Praziquantel foi utilizado como controle positivo na concentração de 10 µM enquanto que vermes em poços contendo meio RPMI-1640 e 1,5% de DMSO foram utilizados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicatas e foram repetidos pelo menos duas vezes. Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias sendo monitorados a cada 24 horas e observados no microscópio óptico invertido (BestScope BS-2090) para avaliação da atividade motora, oviposição e a taxa de mortalidade. O procedimento experimental *in vitro* realizado para avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* está de acordo com trabalhos desenvolvidos por Barth e colaboradores (1996a, 1996b).

4.4.5 Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados com o software Graphpad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla – CA, USA), e eles são expressos como desvio da média padrão (SD). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando análise de variância one-way (ANOVA) em associação com o teste de Turkey para comparações simple-step múltiplas. Todos os resultados foram expressos como valores médios dos grupos ± desvios padrões, e um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.4.6 Análise das lesões na superfície da membrana do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* por Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 para posterior fixação em Tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em stubs metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, realizou-se a metalização cobrindo o material por uma fina camada de ouro, para visualização e análise no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO *IN VITRO* DE DERIVADOS BENZODIOXÓIS SOBRE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*

A tabela 1 expressa os resultados do ensaio esquistossomicida dos derivados benzodioxóis frente a vermes adultos de *S. mansoni* após 120 horas de incubação. Os resultados apontam que os derivados LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09 e LqIT/NW-13 foram capazes de causar 100% de mortalidade dos vermes. Os demais derivados LqIT/NW-02, LqIT/NW-03, LqIT/NW-10, LqIT/NW-11 e LqIT/NW-14, embora não tenham alcançado 100% de mortalidade, foram capazes de causar alterações significativas na motilidade de vermes adultos.

Considerando o efeito máximo alcançado de 100% da mortalidade após 120 horas de exposição, realizamos uma cinética de mortalidade a cada 24 horas durante 5 dias consecutivos utilizando concentrações menores (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M).

De acordo com a tabela 2, os derivados benzodioxóis LqIT/NW-05 e LqIT/NW-07 alcançaram 100% da mortalidade nas primeiras 72 horas de exposição na concentração de 200 μ M. No entanto, o LqIT/NW-05, neste mesmo intervalo de tempo, levou a 100% de mortalidade na concentração de 100 μ M e a 83,3% na concentração de 50 μ M.

Os demais derivados selecionados também apresentaram potencial esquistossomicida, estando dependentes do tempo e da concentração. Na concentração de 100 μ M, foi possível observar que o derivado LqIT/NW-04 alcançou 100% de mortalidade dos vermes em 96 h, enquanto os derivados LqIT/NW-06 e LqIT/NW-13 foram capazes de provocar 100% de mortalidade dos vermes em 120 h. Na concentração de 50 μ M, os derivados LqIT/NW-07 e LqIT/NW-08 promoveram 75% da mortalidade em 96 h, enquanto o derivado LqIT/NW-04 alcançou este mesmo efeito esquistossomicida em 120 h.

Os vermes em contato com o PZQ (controle positivo) apresentaram ausência total de seus movimentos nas primeiras 24h de observação, enquanto os vermes em contato com meio RPMI e DMSO (controle negativo) apresentaram-se ativos com movimentos corporais normais durante todo o experimento (120 horas).

Com relação aos testes de citotoxicidade, os derivados benzodioxóis com os melhores resultados esquistossomicidas (LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09 e LqIT/NW-13) apresentaram valores de IC_{50} que variaram de 45,77 μM a 163 μM (Tabela 2).

Tabela 1: Score de motilidade de vermes controle, tratados com Praziquantel (PZQ) e com derivados benzodioxóis em 120h de incubação.

GRUPOS	Motility score of vermes adulttos de <i>Schistosoma mansoni</i> (%)			
	3	2	1	0
Controle	100			
PZQ (10 µM)				100
Derivados Benzodioxóis (200 µM)				
LqIT/NW-02	0	0	33,33	66,66
LqIT/NW-03	0	0	66,66	33,33
LqIT/NW-04	0	0	0	100
LqIT/NW-05	0	0	0	100
LqIT/NW-06	0	0	0	100
LqIT/NW-07	0	0	0	100
LqIT/NW-08	0	0	0	100
LqIT/NW-09	0	0	0	100
LqIT/NW-10	0	0	33,33	66,66
LqIT/NW-11	0	0	100	0
LqIT/NW-13	0	0	0	100
LqIT/NW-14	0	8,33	91,7	0

Critério de score: 3, vermes ativos com movimentos corporais normais; 2, vermes lentos com retardamento dos movimentos corporais, podendo apresentar apenas movimentos das extremidades anterior e posterior; 1, vermes muito lentos, com movimento ocasional das extremidades ou do intestino; 0, vermes imóveis/mortos com ausência total dos movimentos.

Tabela 2: Atividade antihelmintica contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e citotoxicidade contra células HeLa de derivados benzodioxóis

Derivados	Tempo (h)	Concentração (µM)				Alterações biológicas ao longo do experimento	Valor de IC50 para células HeLa
		200	100	50	25		
		Mortality (%)					
LqIT/NW-04	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas, escurecimento e enovelamento dos vermes.	163 ±9.6
	48	0	0	0	0		
	72	50	33.3	0	0		
	96	91.7	100	16.7	41.7		
	120	100	100	75	66.7		
LqIT/NW-05	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas, exposição de fibras musculares.	45.77 ± 3.63
	48	0	0	0	0		
	72	100	100	83.3	0		
	96	100	100	83.3	25		
	120	100	100	83.3	50		
LqIT/NW-06	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas, exposição de fibras musculares.	60.71 ± 3.83
	48	0	0	0	0		
	72	50	8.3	0	0		
	96	91.7	50	16.7	0		
	120	100	100	25	0		
LqIT/NW-07	24	25	0	0	8.3	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas.	159.6 ± 4.255
	48	100	25	0	16.7		
	72	100	33.3	33.3	16.7		
	96	100	58.3	75	41.6		
	120	100	75	75	58.3		
LqIT/NW-08	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas.	118.3 ± 3.09
	48	0	0	0	0		
	72	50	16.7	16.7	0		
	96	91.7	58.3	75	0		
	120	100	66.7	75	0		
	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento,	
	48	41.7	0	0	0		

LqIT/NW-09	72	66.7	0	0	0	ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas.	156.4 ± 2.79
	96	100	50	0	0		
	120	100	83.3	0	0		
LqIT/NW-13	24	0	0	0	0	Incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas.	123.4 ± 2.78
	48	0	0	0	0		
	72	58.3	83.3	0	0		
	96	100	91.7	66,7	91.7		
	120	100	100	100	100		

Nota: 1 - Durante todo o intervalo de observação, os vermes adultos de *S. mansoni* do grupo controle negativo apresentaram movimentos peristálticos característicos em todo o corpo, com movimento constante, ocasionalmente aderindo ao fundo da placa e sem alteração morfológica aparente. 2 – O PZQ (grupo controle positivo) causou redução imediata da motilidade dos vermes, deixando-os claramente encurtados e após 24 h de exposição, 83,3% os vermes perderam completamente o movimento.

A quimioterapia é a estratégia principal para o controle da esquistossomose, sendo o Praziquantel a droga de escolha no tratamento desta doença (SILVA et al, 2012; AIRES et al, 2014). No entanto, além do Praziquantel ser praticamente inativo contra formas imaturas do parasito, vários relatos de falhas no tratamento e do desenvolvimento de cepas resistentes ao PZQ têm surgido ao longo do tempo (PEREIRA et al, 2010). As campanhas de tratamento em massa com esta droga, por sua vez, apesar de reduzirem a carga parasitária não eliminam a doença, havendo inclusive re-infecções (EWAISHA et al, 2014). Desse modo, existe uma grande necessidade de pesquisas que possam apontar para o surgimento de novas drogas com atividade esquistossomicida (SPIVAK et al, 2014; COWAN et al, 2015).

Trabalhos anteriores que tratam da descoberta de novas drogas esquistossomicidas relatam a importância dos núcleos farmacofóricos que formam os derivados benzodioxóis (tiossemicarbazona, tiazolidinadiona e 1,3-benzodioxol).

Um exemplo é o estudo de Espindola e colaboradores (2015), onde testes com análogos das tiossemicarbazonas foram realizados. Os compostos testados foram capazes de inibir a Cruzaína, uma protease pertencente à família de cisteína proteases e que tem papel fundamental na invasão, diferenciação e proliferação de parasitos em células do hospedeiro.

Ao mesmo tempo Santiago e colaboradores (2014) demonstraram a importância da atividade do tiazol ao testarem um grupo de 10 moléculas sintéticas contendo este núcleo. Esses compostos foram capazes de provocar uma significativa diminuição da motilidade, inibição do acasalamento e da oviposição dos vermes de *S. mansoni*. Após 144 h de observação do experimento *in vitro*, estes compostos também foram capazes de promover um índice de mortalidade de 100% de vermes adultos de *S. mansoni* e estimularam a produção de óxido nítrico e do TNF- α , indicando a presença de atividade imunomodulatória.

Gupta e colaboradores (2014) relatam sobre o anel benzodioxol, indicando que este núcleo deve ser analisado devido às suas atividades antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antimalárica e antioxidante. Além disso, o estudo de Barreiro e colaboradores (2001), argumenta sobre a grande capacidade da subunidade 1,3-benzodioxólica do saflol de interagir com biorreceptores, caracterizando este produto natural como uma potencial matéria-prima de protótipo de fármacos.

Dentre os compostos benzodioxóis avaliados, o composto LqIT/NW-04 foi considerado o menos citotóxico e o derivado LqIT/NW-05, composto mais potente da série, foi considerado o mais citotóxico, como observado na Tabela 02. Apesar disso, os resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* deste estudo não necessariamente determinam que ensaios de toxicidade *in vivo* envolvendo compostos benzodioxóis apresentarão resultados negativos (OLIVEIRA et al, 2017). Oliveira e colaboradores (2015), ao estudarem compostos com atividade antiproliferativa, demonstraram que o derivado mais potente da série, apesar de ser o mais citotóxico contra a linhagem HaCat (immortalize human keratinocyte), não apresentou efeitos colaterais clínicos graves ao ser avaliado em ensaios de toxicidade aguda.

Com relação aos ensaios *in vitro*, notou-se que a maioria dos derivados benzodioxóis foi capaz de levar à mortalidade, bem como alterar parâmetros de motilidade e promover alterações no tegumento dos vermes. Alterações observadas através do microscópio invertido como incapacidade de pareamento, ventosas não aderentes, ausência de ovos, bolhas, escurecimento e enovelamento dos vermes mostram o potencial dos derivados benzodioxóis como protótipo de drogas esquistossomicidas. Além disso, alguns compostos também foram capazes de expor as fibras musculares dos parasitos. Todos os derivados benzodioxóis testados foram capazes de provocar o desacasalamento dos vermes, algo que contribui para o efeito esquistossomicida uma vez que quando isto acontece, há mudanças bioquímicas e fisiológicas representadas pela regressão do ovário, da glândula vitelínica e diminuição do tamanho corpóreo do verme (PELLEGRINO & KATZ, 1968).

Algumas moléculas apresentadas neste estudo apresentam restrição conformacional, fator que pode permitir o desenvolvimento de estudos de determinação da relação estrutura-atividade (POHLMANN ET AL, 1999). A introdução de restritores conformacionais como formação de cadeias n-metiladas, incorporação de ligações duplas ou substituição de grupamentos, pode ser capaz de promover potencialização da atividade farmacológica por estabilização da molécula, aumento da afinidade e da seletividade, além de fornecer informações sobre as necessidades topográficas dos receptores (POHLMANN ET AL, 1999).

Estudos recentes demonstraram a possibilidade de utilização de grupos espaçadores com um determinado grau de restrição conformacional como estratégia para o design de novas drogas. A preparação de n-acilhidrazonas e tiossemicarbazonas com um maior grau de restrição conformacional, por exemplo, levou à produção de compostos com uma maior atividade antiparasitária (MOREIRA ET AL, 2014).

No que se refere à influência da substituição na unidade p-fenil, podemos considerar primeiramente os derivados LqIT/NW-03 e LqIT/NW-04, os quais são compostos não restritos, substituídos na posição 4 do anel 1,3-benzodioxol. O LqIT/NW-03 foi capaz de provocar a mortalidade de apenas 30,77% dos vermes na concentração de 200 μ M em 120 h, embora tenha sido responsável por uma significativa redução da motilidade (69,23%, pontuação 1, 120 horas). Em comparação, o LqIT/NW-04 promoveu 100% da mortalidade dos vermes na concentração de 100 μ M em 96 h. Isso significa que a substituição com o p-bromofenil influencia grandemente na melhoria da atividade em comparação com a substituição com o p-clorofenil, uma vez que o composto LqIT/NW-04 foi capaz de promover mortalidade dos vermes em menor concentração e em menor tempo comparado ao composto LqIT/NW-03.

Ainda com relação à influência da substituição na unidade p-fenil, o mesmo fato se observa ao compararmos o LqIT/NW-05 e o LqIT/NW-06. Ambos os compostos são restritos, substituídos na posição 4 em relação ao anel 1,3-benzodioxol. Ambos também foram capazes de levar a 100% da mortalidade dos vermes na concentração de 100 μ M. Porém, o derivado LqIT/NW-05 levou 72 h para atingir este efeito máximo, enquanto o LqIT/NW-06 levou um tempo maior de 120 h. Novamente a influência do grupo volumoso p-bromofenil parece ser mais importante comparado ao grupo p-clorofenil, uma vez que o composto LqIT/NW-05 foi capaz de promover mortalidade em menor tempo (72 h) comparado ao composto LqIT/NW-06 (120 h).

Além da influência da substituição na unidade p-fenil, devemos considerar a contribuição da posição de ligação ao anel 1,3-benzodioxólico. Ambos os derivados LqIT/NW-08 e LqIT/NW-04 são moléculas não restritas, substituídas com o p-bromofenil. Porém em função da posição de ligação ao anel 1,3-benzodioxol forneceram resultados distintos. Embora tanto o LqIT/NW-08 quanto o LqIT/NW-04

tenham demonstrado resultados significativos, o LqIT/NW-04 ao ser substituído na posição 4 do anel 1,3-benzodioxol, apresentou uma melhor atividade ao promover 100% da mortalidade dos vermes em concentração e tempo menores (100 μ M em 96 horas), comparado ao composto LqIT/NW-08, o qual ao ser substituído na posição 5 do anel 1,3-benzodioxol apresentou 100% da mortalidade em concentração e tempo maiores (200 μ M, 120 horas).

Outro exemplo da influência da posição de ligação ao anel 1,3-benzodioxólico na atividade seria demonstrado pelos derivados LqIT/NW-06 e LqIT/NW-11. Ambas são moléculas restritas, isômeras, substituídas com o p-clorofenil. No entanto, o LqIT/NW-06 ao ser substituído na posição 4 em relação ao anel 1,3-benzodioxólico foi capaz de promover 100% da mortalidade na concentração de 100 μ M em 120 horas, enquanto o LqIT/NW-11 demonstrou uma grande perda da atividade ao ser substituído na posição 5 do anel 1,3-benzodioxol.

Por fim, um fator que teve grande importância na apresentação de atividade esquistossomicida *in vitro* dos derivados benzodioxóis foi a presença ou ausência de restrição conformacional. Os compostos LqIT/NW-02 e LqIT/NW-07 são derivados benzodioxóis não substituídos no anel p-fenil, e substituídos na posição 4 do anel 1,3-benzodioxólico. No entanto o composto não restrito LqIT/NW-02 apresentou uma taxa de mortalidade dos vermes de 64,26%, na concentração de 200 μ M em 120 horas. Já o composto LqIT/NW-07, em função da restrição conformacional representada pelo anel tiazolidínico, foi capaz de promover 100% da mortalidade dos vermes na concentração de 200 μ M em 48 horas. Isso significa que compostos restritos substituídos na posição 4 do anel 1,3-benzodioxólico são capazes de promover uma porcentagem mais alta de mortalidade em menor tempo.

É interessante observar que em compostos substituídos na posição 5 da unidade 1,3-benzodioxólica, a presença de restrição conformacional promove resultados menos promissores quando comparado com moléculas não restritas. Isso pode ser observado nos resultados apresentados pelos derivados LqIT/NW-09 e LqIT/NW-10. Ambos são derivados substituídos na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico e ambos possuem o grupamento metoxila, o qual além de facilitar a interação com o biorreceptor por ser volumoso, também possui efeito anti-parasitário já demonstrado anteriormente na literatura por Pitta e colaboradores (2006). No entanto o LqIT/NW-09 apresentou atividade esquistossomicida claramente superior ao LqIT/NW-10, sendo capaz de provocar 100% de mortalidade

na concentração de 200 μ M em 96 horas. O LqIT/NW-10, molécula restrita, levou 66,66% dos vermes à mortalidade na concentração de 200 μ M em 120 horas de observação. Neste segundo caso, compostos não restritos substituídos na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico são capazes de promover uma porcentagem mais alta de mortalidade em menor tempo.

Desse modo, moléculas restritas com substituição na posição 4 do anel 1,3-benzodioxólico apresentam melhor atividade esquistossomicida em comparação com moléculas restritas substituídas na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico. Ao mesmo tempo, moléculas não restritas com substituição na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico apresentam melhor atividade esquistossomicida do que moléculas restritas substituídas na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico.

Isso se explica porque compostos substituídos na posição 5 sem restrição conformacional podem vir a assumir conformação que favoreça a interação. Nesses casos, o volume e os efeitos eletrônicos dos substituintes no anel p-fenil, como o grupamento metoxila, o grupamento naftil e halogênios como o bromo e o cloro, também podem exercer uma influência na melhora ou piora da atividade. Podemos observar esse comportamento nos resultados apresentados pelos derivados LqIT/NW-08, LqIT/NW-09, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14, os quais são compostos não restritos, substituídos na posição 5 do anel 1,3-benzodioxólico, que apresentaram uma atividade esquistossomicida promissora. Ambos os compostos LqIT/NW-09 e LqIT/NW-13, derivados benzodioxóis substituídos com os grupos volumosos metoxila e naftil, respectivamente, foram capazes de levar 100% dos vermes à mortalidade na concentração de 200 μ M em 96 horas. O LqIT/NW-08, por sua vez, é um derivado substituído com o grupamento p-bromofenil, o qual apresentou uma mortalidade de 100% dos vermes na concentração de 200 μ M em 120 horas.

O composto LqIT/NW-14, embora seja um composto não restrito substituído na posição 5 do anel 1,3-benzodioxol, devido à substituição com o p-clorofenil, não foi capaz de levar os vermes à mortalidade durante todo o tempo de observação. Apesar disto, o LqIT/NW-14 foi capaz de diminuir a motilidade dos vermes a níveis mínimos a partir de 72 horas em todas as concentrações.

Ao observarmos os resultados dos derivados que apresentaram as melhores atividades, notaremos que foram determinados pela presença ou ausência de restrição conformacional e substituição do anel fenílico.

Desse modo, os derivados que apresentaram melhor atividade esquistossomocida foram majoritariamente compostos restritos substituídos na posição 4 do anel 1,3-benzodioxol (LqIT/NW-05, LqIT/NW-06 e LqIT/NW-07) e compostos não restritos substituídos na posição 5 do anel 1,3-benzodioxol (LqIT/NW-08, LqIT/NW-09 e LqIT/NW-13). As exceções são representadas pelos derivados benzodioxóis LqIT/NW-04 (não restrito e substituído na posição 4 do anel) e LqIT/NW-14 (não restrito e substituído na posição 5 do anel), os quais apresentaram resultados fora do padrão esperado devido aos efeitos eletrônicos provocados pelos substituintes p-bromofenil (maior atividade) e p-clorofenil (menor atividade), respectivamente.

5.2 DANOS ULTRAESTRUTURAIS DE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* TRATADOS COM O DERIVADO BENZODIOXÓLICO LQIT/NW-05

O derivado benzodioxólico LqIT/NW-05 foi avaliado quanto ao seu potencial em provocar alterações ultraestruturais no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*. Comparado aos demais derivados, ele mostrou ser o mais efetivo em causar a morte dos vermes em menor intervalo de tempo.

Foram utilizados vermes incubados em LqIT/NW-05 nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M. A análise se deu em 24 h, tempo em que foi observada uma significativa alteração da motilidade dos vermes, sem que estes estivessem mortos.

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) revelou danos ultraestruturais da superfície de membrana exposta ao derivado LqIT/NW-05, comparado com o controle negativo (não tratado) e positivo (exposto ao Praziquantel).

Os vermes incubados durante 24 h em meio RPMI 1640 suplementado e 1,5% de DMSO mostraram topografia e estrutura superficial intacta (Fig25 A1-B3). O canal ginecológico (CG) de vermes adultos machos (Fig25. A1), uma dobra longitudinal no corpo médio e posterior que abriga a fêmea para acasalamento e reprodução, apresentou-se completamente íntegro. A porção anterior é caracterizada por ventosa oral (OS) e ventosa ventral ou acetábulo (VS) (Fig25. A2). Com uma ampliação maior da região dorsal média dos vermes, observou-se um grande número de tubérculos (Tu) (Fig25. A3); Vermes adultos fêmeas apresentaram um corpo cilíndrico (Fig25. B1), ventosa oral (OS) e ventosa ventral ou acetábulo (VS) (Fig25.B2), além de tegumento liso (ST) (Fig25. B3).

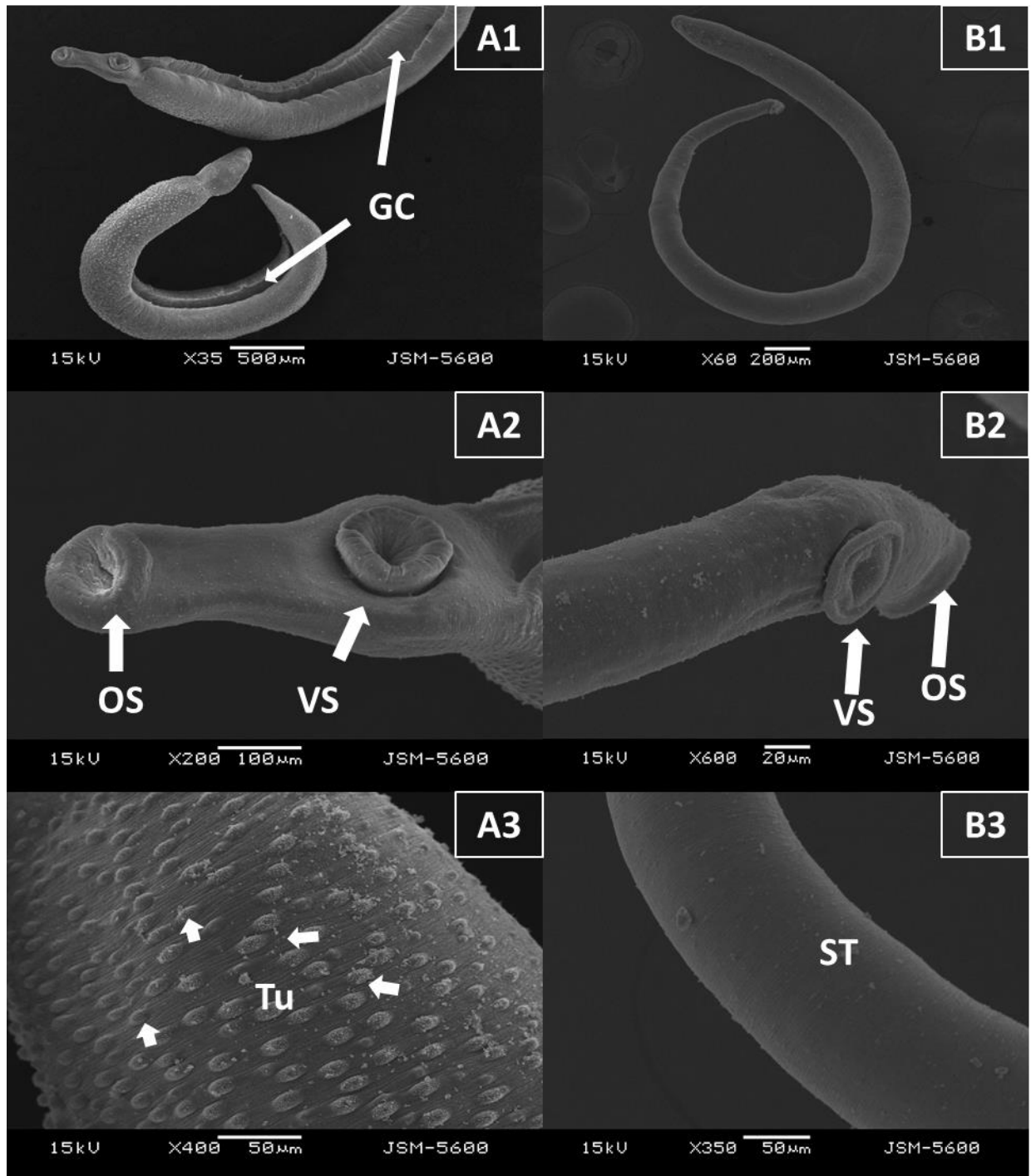


Fig.25. (A1-B3) Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos (A1-A3) e fêmeas (B1-B3) de *S. mansoni* em meio RPMI 1640 suplementado e 1.5% DMSO, apresentando superfície intacta; (A1, 35x) Vermes adultos machos apresentando o canal ginecóforo (GC); (A2, 200x) Porção anterior caracterizada por ventosa oral (OS) e ventosa ventral ou acetábulo (VS); (A3, 400x) Com uma ampliação maior da região dorsal média dos vermes, observou-se um grande número de tubérculos (Tu); (B1, 60x) Vermes adultos fêmeas apresentaram um corpo cilíndrico; (B2, 600x) ventosa oral (OS) e ventosa ventral ou acetábulo (VS) e (B3, 350x) tegumento liso (ST).

Os efeitos *in vitro* de PZQ (10 μ M) em vermes adultos machos e fêmeas causaram uma contração óbvia de músculos longitudinais, resultando em evidente curvatura e encurtamento dos vermes (Fig26. A e C). Os vermes machos adultos foram marcados por lesões graves que incluíram colapso de tubérculos, perda de espículas, bolhas sobre a superfície do tegumento (B) e aparência de furos e ruptura de bolhas no tegumento (seta) (Fig26.B). Em vermes adultos fêmeas, além da evidente contração longitudinal, foi possível observar contração da musculatura circular causando formação de anéis que se apresentam em tamanhos variados (setas) e desaparecimento de rugas (Fig26. C e D). Ao observarmos uma ampliação, é possível verificar a presença de várias bolhas distribuídas em todo o corpo (B) e a formação de edema no tegumento (S) (Fig26.D).

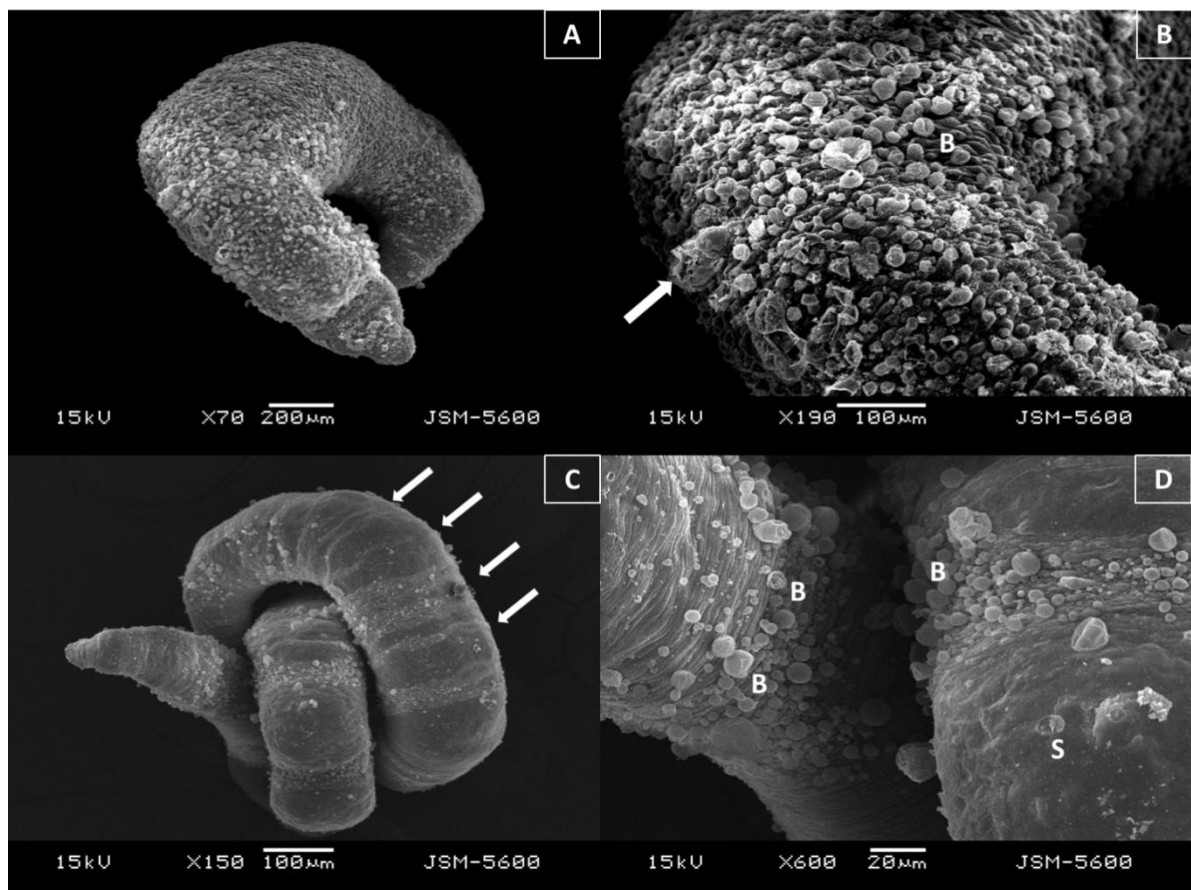


Fig. 26. (A-D) Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos e fêmeas de *S.mansoni* tratados com PZQ (10 μ M); Contração de músculos longitudinais, resultando em evidente curvatura e encurtamento dos vermes adultos machos (A, 70x) e fêmeas (C, 150x); (B, 190x) Vermes adultos machos apresentando lesões severas, incluindo colapso de tubérculos, perda de espículas, bolhas sobre a superfície do tegumento (B) e aparência de furos e ruptura de bolhas no tegumento (setas); (C, 150x) Contração da musculatura circular causando formação de anéis que se mostram em tamanhos variados

(setas) e desaparecimento de rugas;(D, 600x) Em ampliação se observam várias bolhas em todo o corpo (B) e edema (S).

A figura 27 mostra vermes adultos machos (Fig27 A1-B4) e fêmeas (Fig27 C1-D4) incubados por 24h em LqIT/NW-05 nas concentrações de 50 (A1-A4 e C1-C4) e 100 μ M (B1-B4 e D1-D4). Em ambas as concentrações profundas mudanças na superfície dos vermes foram observadas resultado da destruição do tegumento em todos os vermes examinados. Apesar das características das lesões tegumentares serem semelhantes foi possível visualizar maiores danos na maior concentração analisada.

Nas figuras 27 A1 e B2 observa-se uma extensa destruição do tegumento (TD) com bolhas (setas) e áreas de erosão (cabeça de seta) na porção anterior de vermes machos. Na concentração de 100 μ M também se observa desintegração na borda da ventosa ventral (D) e presença de bolhas (setas). Além disto, na porção posterior proximal é evidente a destruição do tegumento com perda de tubérculos (TD) e numerosas bolhas (setas) (Fig27 B2).

A figura A2 (porção terminal) e as figuras A3 e B3 (porção média) retratam a destruição do tegumento de vermes machos (TD) mostrando perda de tubérculos, espinhos e das pregas paralelas. Na concentração de 50 μ M, figura A2, é possível observar áreas com inchaço (S) e tubérculos aglomerados (AT). Em maior magnificação, as figuras A4 e B4 mostram alterações severas do tegumento caracterizadas por desintegração de tubérculos (D) e erosão do tegumento (cabeça de seta) que resultaram na exposição da membrana basal.

Nos vermes fêmeas o tegumento apresentou aspecto áspero em toda sua extensão (Fig27 C1 and D2). Em maior magnificação, as fig3 C2 e D3 e fig3 C3-4 e D4 mostram alterações caracterizadas por extensa descamação (SI), bolhas (setas) e áreas com erosões nas regiões posterior e média (cabeça de seta), respectivamente. Também é possível observar, na concentração de 100 μ M, áreas focais com aparente inchaço (S) com fusão de rugas tegumentais (fig27 D1-2).

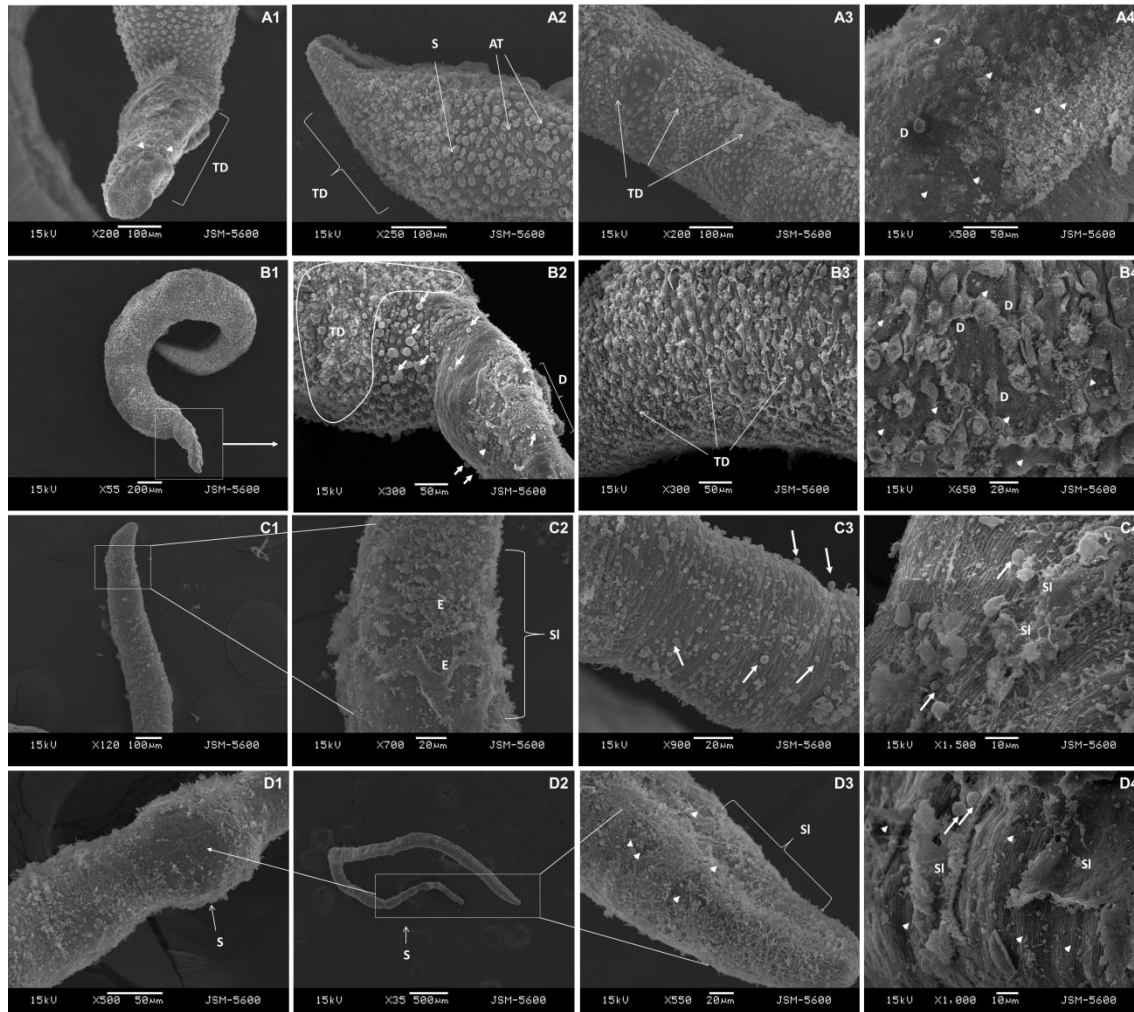


Fig. 27. (A1-D4) Microfotografia eletrônica de varredura de vermes adultos machos (A1-B4) e fêmeas (C1-D4) de *S.mansoni* incubados por 24h em LqIT/NW-05 nas concentrações de 50 e 100 μ M; (A1,200x; B2,300x) Extensa destruição do tegumento (TD) com bolhas (setas) e áreas de erosão (cabeça de seta) na porção anterior de vermes machos; (B2,300x) Na concentração de 100 μ M é possível observar desintegração na borda da ventosa ventral (D) e presença de bolhas (setas), além de destruição do tegumento com perda de tubérculos (TD) e numerosas bolhas (setas) na porção posterior proximal; Porção terminal (A2,250x) e porção média (A3,200x and B3,300x) apresentando destruição do tegumento de vermes machos (TD) com perda de tubérculos, espinhos e das pregas paralelas; (A2,250x) Na concentração de 50 μ M há áreas apresentando inchaço (S) e tubérculos aglomerados (AT); (A4, 500x and B4, 650x) Em maior magnificação é possível observar alterações severas do tegumento caracterizadas por desintegração de tubérculos (D) e erosão do tegumento (cabeça de seta) que resultaram na exposição da membrana basal; (C1,120x and D2,35x) Tegumento com aspecto áspero em toda a extensão do verme fêmea; (C2,700x and D3,550x) and (C3,900x; C4,1.500x and D4,1.000x) Em maior magnificação vermes fêmeas apresentam alterações caracterizadas por extensas descamação (SI), bolhas (setas) e áreas com erosões nas regiões posterior e média (cabeça de seta); (D1,500x and D2,35x) Na concentração de 100 μ M observa-se áreas focais com aparente inchaço (S) e fusão de rugas tegumentais.

O tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* constitui importante alvo biológico de drogas esquistossomicidas, uma vez que se trata de uma camada protetora responsável pela absorção de nutrientes, funções secretoras e proteção do parasito (ALMEIDA et al, 2016). Desse modo, alterações ultraestruturais na

superfície do tegumento têm sido utilizadas como um importante parâmetro a ser avaliado em testes de drogas esquistossomicidas (KAMEL et al, 2017).

Vermes adultos machos e fêmeas, incubados por 24 h com o derivado LqIT/NW-05 apresentaram danos no tegumento caracterizados por extensa descamação e edema, destruição de tubérculos, formação de bolhas e exposição da camada muscular. Essas alterações foram semelhantes às aquelas visualizadas em vermes adultos de *Schistosoma mekongi* tratados com Artesunato (JIRAUNGKOORSKULET et al., 2006), em *Schistosoma haematobium* tratados com Atorvastatina combinada com acetato de medroxyprogesterona (SOLIMAN & IBRAHIM, 2005), e em *S. mansoni* tratadas com derivados da tiossemicarbazona e tiazóis (SANTIAGO et al, 2014), Miltefosina (BERTÃO et al, 2012), (Z)-1-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxy-benzylidene)-imidazolidin-2-one (LPSF/PTS23) (MATOS-ROCHA et al, 2017), 1-benzyl-4-[(4-chloro-phenyl)-hydrazono]-5-thioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT-05) (NEVES et al, 2011) e Primaquina (KAMEL et al, 2017). Assim, sugerimos que o efeito esquistossomicida causado pelo LqIT/NW-05 pode estar associado à ação sobre a superfície do tegumento dos vermes.

Apesar das características das lesões tegumentares terem sido semelhantes nas concentrações de 50 e 100 µM de LqIT/NW-05, foi possível visualizar maiores danos na maior concentração. Esse achado está de acordo com estudos que investigaram alterações ultraestruturais causadas por compostos naturais ou sintéticos com potencial esquistossomicida, como extratos de folhas de Romã (YONES et al., 2016), óleo essencial *Mentha x villosa* (MATOS-ROCHA et al., 2016), Mefloquina (MANNECK et al., 2010) e β-lapachona (AIRES et al., 2014).

A presença de grupamentos fenil e halogênicos na estrutura de compostos benzodioxóis permite que haja um aumento da absorção através das membranas celulares (THOMAS, 2003). Sobre esse aspecto, tais grupamentos poderiam estar diretamente envolvidos com o efeito esquistossomicida do LqIT/NW-05. Nossa hipótese é corroborada pelos resultados apresentados por Brandão e colaboradores (2004), Matos-Rocha e colaboradores (2017), Albuquerque e colaboradores (2005) e Albuquerque e colaboradores (2007), os quais verificaram que derivados imidazolidínicos possuindo grupamentos halogênicos foram capazes de provocar mudanças ultraestruturais no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*.

Embora o mecanismo pelo qual os derivados benzodioxóis exercem atividade esquistossomicida *in vitro* ainda não tenha sido esclarecido, as alterações tegumentares causadas pelo LqIT/NW-05 podem ter modificado o metabolismo dos vermes interferindo em atividades vitais como a absorção de nutrientes, secreção de metabólitos e supressão da resposta imune.

5.3 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURAS DE CÉLULAS HELA

Foi realizado um estudo sobre a produção de óxido nítrico, o qual foi determinado pela dosagem de nitrito em sobrenadante de culturas de células HeLa, expostas aos compostos LqIT/NW-02, LqIT/NW-03, LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09, LqIT/NW-10, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14 por um período de 48h (Gráfico 1)

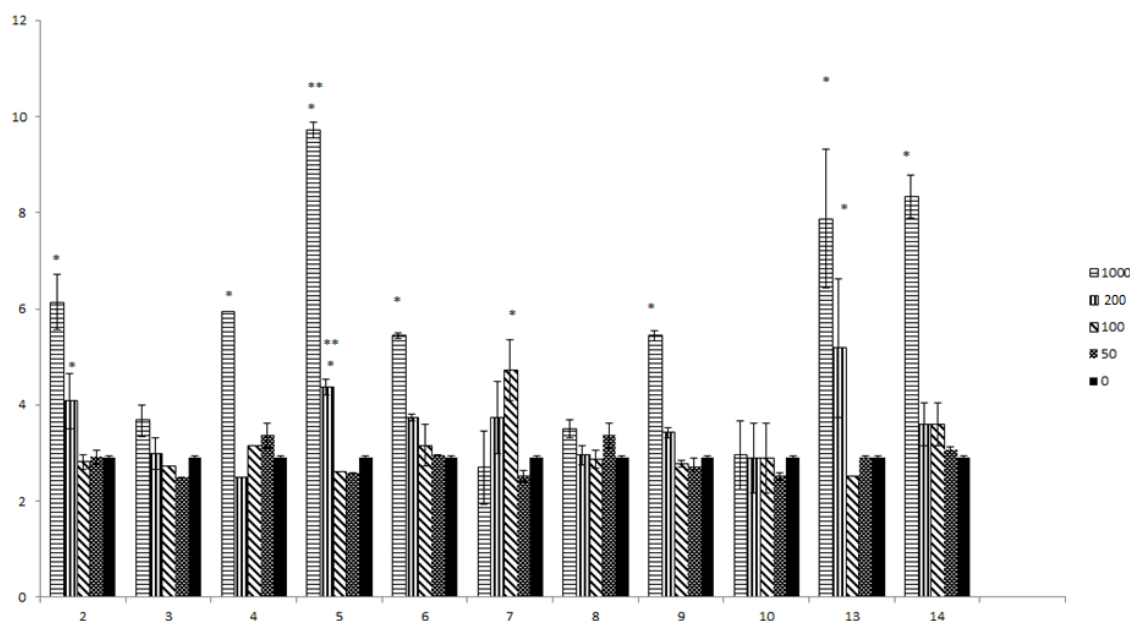


Gráfico 01. Produção de Nitrito em sobrenadantes de cultura de células HeLa na presença dos derivado LqIT/NW-02, LqIT/NW-03, LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-08, LqIT/NW-09, LqIT/NW-10, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14, respectivamente.

Obs. *concentração significativamente maior que o meio; ** significativamente maior que as outras drogas $p < 0,05$; Os dados são expressos como valor médio e erro padrão da média ($n = 3$) e foram analisados usando 1-way ANOVA e Turkey. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os compostos que se destacaram inicialmente foram os derivados LqIT/NW-02, LqIT/NW-05 e LqIT/NW-13, os quais foram capazes de estimular a produção de NO nas concentrações de 1000 μM e 200 μM . O derivado LqIT/NW-14 possivelmente apresenta um importante efeito imunomodulador, o qual foi refletido

na diminuição da motilidade nos testes *in vitro*, uma vez que foi capaz de estimular o aumento da produção de NO na concentração de 1000 μ M juntamente com os derivados LqIT/NW-04, LqIT/NW-06 e LqIT/NW-09. O derivado LqIT/NW-07 também se destacou, uma vez que foi o composto que apresentou aumento da produção do óxido nítrico na menor concentração (100 μ M). O composto LqIT/NW-05 apresentou o melhor resultado do estudo, uma vez que apresentou concentrações de NO estatisticamente superiores tanto em relação à concentração basal, quanto comparado a concentrações de óxido nítrico estimuladas pelos demais derivados testados. As concentrações maiores (1000 μ M e 200 μ M) induziram maior aumento da produção de óxido nítrico em comparação com as concentrações menores (100 μ M e 50 μ M) na maioria dos compostos. Para os demais compostos (LqIT/NW-03, LqIT/NW-08 e LqIT/NW-10) não foram observadas alterações significativas na produção de óxido nítrico nas concentrações testadas.

Estudos demonstraram que doadores de óxido nítrico ou análogos que são capazes de estimular a sua liberação, possuem atividade imunomodulatória (KORHONEN et al, 2008). Desse modo, a maioria dos derivados benzodioxóis testados neste trabalho possui uma possível atividade imunomodulatória, uma vez que foram capazes de estimular a produção de óxido nítrico, sendo o derivado LqIT/NW-05 o composto que apresentou o melhor resultado.

A importância dessa descoberta se baseia em estudos os quais demonstraram que efeitos antifibróticos e antiparasitários estão relacionados diretamente com a produção de óxido nítrico (NEVES et al, 2011; BRUNET et al, 2001). Yone e colaboradores (2016) também relataram que a produção de óxido nítrico aumenta em resposta a infecções parasitárias como a esquistossomose, indicando a que a produção de NO faz parte do mecanismo de resposta imune inata. Além disso, trabalhos avaliaram que a citotoxicidade mediada por células endoteliais e macrófagos contra esquistossômulos de *Schistosoma mansoni in vitro* pode estar relacionada com a produção de óxido nítrico (SHEN et AL, 2017).

Os compostos testados LqIT/NW-02, LqIT/NW-04, LqIT/NW-05, LqIT/NW-06, LqIT/NW-07, LqIT/NW-09, LqIT/NW-13 e LqIT/NW-14 possivelmente apresentam um importante efeito imunomodulador, o qual foi refletido no aumento da produção de óxido nítrico em diferentes concentrações (1000 μ M, 200 μ M e 100 μ M). No entanto, corroborando com os resultados da avaliação da susceptibilidade *in vitro*, bem como com o estudos de alterações no tegumento de vermes de *Schistosoma mansoni*, o

derivado benzodioxólico LqIT/NW-05 apresentou o melhor resultado do estudo, uma vez que apresentou concentrações de óxido nítrico estatisticamente superiores tanto em relação à concentração basal, quanto comparado a concentrações de óxido nítrico estimuladas pelos demais derivados testados. Apesar dos resultados promissores, ainda são necessários estudos suplementares que possam determinar se os derivados benzodioxóis interagem diretamente com a enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), ou se atuam através da inibição ou ativação de citocinas responsáveis pela produção e regulação de óxido nítrico (SANTOS et al, 2011).

6 CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram avaliadas doze moléculas com potencial atividade esquistossomicida, pertencentes à classe das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, todas apresentando em comum o anel 1,3-benzodioxol;
- Os derivados benzodioxóis apresentam atividade esquistossomicida *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*, com significativa redução da motilidade, alterações no tegumento e mortalidade dos vermes, além de possível efeito imunomodulatório;
- Os derivados que apresentaram melhor atividade esquistossomicida *in vitro* foram majoritariamente compostos restritos substituídos na posição 4 do anel 1,3-benzodioxol e compostos não restritos substituídos na posição 5 do anel 1,3-benzodioxol;
- O derivado LqIT/NW-05, em particular, apresentou os melhores resultados para a atividade esquistossomicida em todos os testes realizados, podendo ser considerado um potencial composto protótipo para o desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* dos derivados benzodioxóis;
- Realizar ensaio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com o derivado LqIT/NW-05;
- Determinar o mecanismo de ação dos derivados benzodioxóis através de estudos de docking;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos derivados através da dosagem de citocinas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R.A.; LOUTFY, N.; HASSAN A. Experimentally promising antishistosomial drugs: a review of some candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res.* 105: 899-906, 2009.
- ABDULLA, M.H.; LIM, K.C.; SAJID M. *et al.* Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med.* 4(1):e14, 2007.
- AIRES, A.L.; XIMENES, E.C.P.A.; SILVA, R.A.R. *et al.* Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Experimental Parasitology* 142, 83–90, 2014.
- AKGEMCI, E.G.; SAF, A.O.; TASDEMIR, H.U. *et al.* Spectrophotometric, voltammetric and cytotoxicity studies of 2-hydroxy-5-methoxyacetophenone thiosemicarbazone and its N(4)-substituted derivatives: a combined experimental-computational study, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 136 Pt B:719-25, 2015.
- ALBUQUERQUE, M.C.; SILVA, T.G.; PITTA, M.G. *et al.* Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie* 60:13-7, 2005.
- ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; PITTA, M.G.R.; IRMÃO, J.I. *et al.* Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy* 26: 65-9, 2007.
- ALMEIDA, L.M.S.; CARVALHO, L.S.A.; GAZOLLA, M.C. *et al.* Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- AMARAL, A.T.; MONTANARI, C.A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento de fármacos. *Química Nova*, 25(1), p. 39-44, 2002.
- ANDRADE, G.; BERTSCH, D.J.; GAZZINELLI, A. *et al.* Decline in infection-related morbidities following drug-mediated reductions in the intensity of *Schistosoma* infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005372, 2017.
- ANGELUCCI, F.; MIELE, A.E.; BOUMIS, G. *et al.* Macromolecular Bases of Antischistosomal Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2012-2028, 2011.
- ARNON, R.; SILMAN, I.; TARRAB-HAZDAI, R. Acetylcholinesterase of *Schistosoma mansoni*— Functional correlates. *Protein Science* 8:2553–2561, 1999.
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; GRADONI, L. The Anti-Parasitic Effects of Nitric Oxide. *IUBMB Life*, 55(10–11): 573–578, 2003.

ATTIA, Y.M.; ELALKAMY, E.F.; HAMMAM, O.A. *et al.* Telmisartan, an AT1 receptor blocker and a PPAR gamma activator, alleviates liver fibrosis induced experimentally by *Schistosoma mansoni* infection. *Parasites & Vectors*, 6:199, 2013.

BABAHAN, I.; ÖZMEN, A.; ORHAN, N. *et al.* Synthesis, characterization, and *in vitro* anti-neoplastic activity of novel vic-dioximes bearing thiosemicarbazone side groups and their mononuclear complexes. *Bioorganic Chemistry* 53, 92–98, 2014.

BARBOSA, L.M.; SILVA, L.K.; REIS, E.A. *et al.* Characteristics of the human host have little influence on which local *Schistosoma mansoni* populations are acquired. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(12):e2572, 2013.

BARBOSA, C.S.; SANTOS, R.S.; GOMES, E.S. *et al.* Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. *Rev Patol Trop*, vol. 43 (4): 436-445. out.-dez. 2014.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos.* 2ª Ed. Porto Alegre, Art Med Ltda, 2008.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; RODRIGUES, C.R. *et al.* Estratégias em química medicinal para o planejamento de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37(3), 2001.

BARREIRO, E.J. *Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo.* *Química Nova*, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2001.

BARRETO, A.V.M.S.; MELO, N.D.; VENTURA, J.V.T. *et al.* Análise da positividade da esquistossomose mansoni em Regionais de Saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 24, n. 1, p. 87-96, Mar. 2015.

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

BARTH, L.R.; FERNANDES, A.P.; RODRIGUES, V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38(6):423-6, 1996.

BECK, L.; VAN-LUME, D.S.; SOUZA, J.R. *et al.* Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Tropica* 108, 229–233, 2008.

BEHBEHANI, H.; IBRAHIM, H.M. 4-Thiazolidinones in Heterocyclic Synthesis: Synthesis of Novel Enaminones, Azolopyrimidines and 2-Arylimino-5-arylidene 4-thiazolidinones. *Molecules* 17, 6362-6385, 2012.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, Vol. 27, No. 3, 461-471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4, 31-39, 2004.

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

BERTÃO, H.G.; SILVA, R.A.; PADILHA, R.J. *et al.* Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitology Research* 110: 2465–2473, 2012.

BRANDÃO, S.S.F.; ANDRADE, A.M.C.; PEREIRA, D.T.M. *et al.* A novel way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones. *Heterocyclic Communications*. 10:9-14, 2004.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6^o edição. Ministério da Saúde, Brasília, 2007.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.*, v. 1, p.1457–1467. 2001.

CAROD-ARTAL, F.J. Neurological complications of *Schistosoma* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 107—116, 2008.

CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; PEREIRA, H.M. *et al.* Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: Kinetic and structural studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 1421–1427, 2010.

CASTIÑEIRAS, A.; GARCÍA-SANTOS, I.; NOGUEIRAS, S. *et al.* Supramolecular interactions in biologically relevant compounds. 2-Pyrazineformamide thiosemicarbazones and some products of their cyclization. *Journal of Molecular Structure* 1074, 1–18, 2014.

CHEN, H.; HE, Y.; LIU, W. *et al.* Rosiglitazone prevents murine hepatic fibrosis induced by *Schistosoma japonicum*. *World J Gastroenterol*, 14(18), 2008.

CHEN, T.T.; WU, L.S.; HSU, P.W. *et al.* Mitochondrial dynamics in the mouse liver infected by *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*. 148, 13–23, 2015.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A. *et al.* Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular & Biochemical Parasitology*, 195, 23–29, 2014.

COELHO, P.M.; PEREIRA, L.H.; MELLO, R.T. Antischistosomal activity of acridanone-hydrazones in *Cebus* monkeys experimentally infected with the SJ strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 28: 179-183, 1995.

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.L. *et al.* Human schistosomiasis. The Lancet. April 2014.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RODRIGUES CALDAS, I.; MARTINS-FILHO, O.A. *et al.* Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic áreas. Acta Tropica 77, 141–146, 2000.

COSTA, P.R.R. Safrol e Eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. Química Nova. 23(3), 2000.

COWAN, N.; YAREMENKO, I.A.; KRYLOV, I.B. *et al.* Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine derivatives against *Schistosoma mansoni*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 23, 5175–5181, 2015.

DOERIG, C.; GREVELDING, C.G. Targeting kinases in Plasmodium and Schistosoma: Same goals, different challenges. Biochimica et Biophysica Acta, 1854, 1637–1643, 2015.

DUVALL, R.H.; DEWITT, W.B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 16, 483-486, 1967.

ELBAKRY, K.A.; ABDELAZIZ, M.M. Myrrh and artesunate modulate some Th1 and Th2 cytokines secretion in *Schistosoma mansoni* infected mice. Central European Journal of Immunology, 41 (2): 138-142, 2016.

EL-EMAM, M.A.; MAHMOUD, S.S.; BAYAUMY, F.E.A. Potential role of mefloquine (antimalarial drug) and methanol extract of *Chenopodium ambrosioides* and *Sesbania sesban* in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 5(8): 608-613, 2015.

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

ERAKY, M.A.; ALY, N.S.M.; SELEM, R.F. *et al.* In Vitro Schistosomicidal Activity of Phytol and Tegumental Alterations Induced in Juvenile and Adult Stages of *Schistosoma haematobium*. Korean Journal of Parasitology, 54(4): 477- 484, 2016.

ESHETE, F.; BENNETT, J.L. *Schistosoma mansoni*: biochemical characteristics of the antischistosomal effects of Ro 15-5458. Exp Parasitol, 71(1):69-80, 1990.

ESPÍNDOLA, J.W.; CARDOSO, M.V.; FILHO, G.B. *et al.* Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. European Journal of Medicinal Chemistry, V.101, 28, 2015.

EWAISHA, R.E.; BAHEY-EL-DIN, M.; MOSSALLAN, S.F. *et al.* Combination of the two schistosomal antigens Sm14 and Sm29 elicits significant protection against experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Experimental Parasitology* 145, 51–60, 2014.

FAHMY, S.R.; RABIA, I.; MANSOUR, E.M. The potential role of mefloquine against *Schistosoma mansoni* infection by prohibition of hepatic oxidative stress in mice. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 67, 40–47, 2014.

FAKAHANY, A.F.; YOUNIS, M.S.; EL HAMSHARY, A.M.S. *et al.* Effect of mefloquine on worm burden and tegumental changes in experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*.2, 7–11, 2014.

FERRARI, T.C.A; MOREIRA, P.R.R.; CUNHA, A.S. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. *Acta Tropica* 108, 89–97, 2008.

FERREIRA, M.S.; OLIVEIRA, R.N.; OLIVEIRA, D.N. *et al.* Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: an expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 45, 385–391, 2015.

FONSECA, N.C.; CRUS, L.F.; SILVA VILLELA, F. *et al.* Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure- Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and *Schistosoma mansoni* Cathepsin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), 2015.

FREZZA, T.; GREMIÃO, M.P.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. *et al.* Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. *Acta Tropica* 128, 70– 75, 2013.

GEIGER, S.M. Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in endemic populations co-infected with soil-transmitted helminths: Present knowledge, challenges, and the need for further studies. *Acta Tropica*. 108, 118–123, 2008.

GOLD, D.; ALIAN, M.; DOMB, A. *et al.* Elimination of *Schistosoma mansoni* in infected mice by slow release of Artemisone. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 7(2), 241-247, 2017.

GOMES, E.C.S.; MESQUITA, M.C.S.; REHN, V.N.C. *et al.* Urban transmission of schistosomiasis: new epidemiological situation in the forest area of Pernambuco. *Rev Bras Epidemiol*, 19(4): 822-834, 2016.

GUIDI, A.; LALLI, C.; PERLAS, E. *et al.* Discovery and Characterization of Novel Anti-schistosomal Properties of the Anti-anginal Drug, Perhexiline and Its Impact on *Schistosoma mansoni* Male and Female Reproductive Systems. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(8): e0004928, 2016.

GUPTA, S.D.; RAO, G.B.; BOMMAKA, M.K. *et al.* Eco-sustainable synthesis and biological evaluation of 2-phenyl 1,3-benzodioxole derivatives as anticancer, DNA binding and antibacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry* ,xxx, xxx–xxx, 2014.

HAN, Y.; FU, Z.; HONG, Y. *et al.* Inhibitory Effects and Analysis of RNA Interference on Thioredoxin Glutathione Reductase Expression in *Schistosoma japonicum*. *Journal of Parasitology*, 100(4): 463-469, 2014.

HAZRA, S.; XIONG, S.; WANG, J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 279:11392–11401, 2004.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. Sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 9: 283-298, 1934.

JAGADEESH, M.; LAVANYA, M.; KALANGI, S.K. *et al.* Spectroscopic characterization, antioxidant and antitumour studies of novel bromo substituted thiosemicarbazone and its copper(II), nickel(II) and palladium(II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 135, 180–184, 2015.

JILKOVÁ, A.; HORN, M.; REZACOVÁ, P. *et al.* Activation Route of the *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch. *Structure* 22, 1786–1798, 2014.

JIRAUNGKOORSKULET, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P. *et al.* *Schistosoma mekongi*: the in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke. *Experimental Parasitology*, 113(1):16-23, 2006.

KAMEL, R.O.; BAYAUMY, F.E. Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 112(4): 247-254, 2017.

KATZ, N.; CHAIA, G. Coprological Diagnosis of schistosomiasis. I. Evaluation of quantitative. *Inst. Med. Trop. S. Paulo* 10: 295-298, 1968.

KATZ, N.; COELHO, P.M.Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. *Acta Tropica*, 108, 72–78, 2008.

KHAN, M.O.F.; KEISER, J.; AMOYAW, P.N.A. *et al.* Discovery of Antischistosomal Drug Leads Based on Tetraazamacrocyclic Derivatives and Their Metal Complexes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(9), 2016.

KHANDANI, M.; SEDAGHAT, T.; ERFANI, N. *et al.* Synthesis, spectroscopic characterization, structural studies and antibacterial and antitumor activities of diorganotin complexes with 3-methoxysalicylaldehyde thiosemicarbazone. *Journal of Molecular Structure*, 1037, 136–143, 2013.

KORHONEN, R.; KOSONEN, O.; HÄMÄLÄINEN, M. *et al.* Nitric oxide-releasing compounds inhibit the production of interleukin- 2, -4 and -10 in activated human lymphocytes. *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 103:322–328; 2008.

KON, K.; IKEJIMA, K.; HIROSE, M. *et al.* Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 291, Issue1, Pages 55–61, 2002.

LAMBERTON, P.H.L.; FAUST, C.L.; WEBSTER, J.P. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infectious Diseases of Poverty*, 6:110, 2017.

LI, H.; WANG, W. Apropos: critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infectious Diseases of Poverty*, 6:54, 2017.

LI, T.; ZINIEL, P.D.; HE, P.Q. *et al.* High-throughput screening against thioredoxin glutathione reductase identifies novel inhibitors with potential therapeutic value for schistosomiasis. *Infectious Diseases of Poverty*, 4:40, 2015.

LIESEN, A.P.; AQUINO, T.M.; GOES, A.J.S. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. *Quim. Nova*, 31(2), 369-376, 2008.

LONG, T.; CAILLIAU, K.; BECKMANN, S. *et al.* *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *International Journal for Parasitology* 40, 1075–1086, 2010.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTA, P. *et al.* The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, 133, 18–27, 2013.

MACDONALD, K.; BUXTON, S.; KIMBER, M.J. *et al.* Functional Characterization of a Novel Family of Acetylcholine-Gated Chloride Channels in *Schistosoma mansoni*. *PLOS Pathogens*, vol 10, Issue 6, e1004181, 2014.

MACDONALD, K.; KIMBER, M.J.; DAY, T.A. *et al.* A constitutively active G protein-coupled acetylcholine receptor regulates motility of larval *Schistosoma mansoni*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 202, 29–37, 2015.

MANNECK, T.; BRAISSANT, O.; ELLIS, W. *et al.* *Schistosoma mansoni*: Antischistosomal activity of the four optical isomers and the two racemates of mefloquine on schistosomula and adult worms *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology* 127, 260–269, 2010.

MARTINS-MELO, F.R.; PINHEIRO, M.C.; JUNIOR RAMOS, A.N. *et al.* Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000–2011. *International Journal for Parasitology* 44, 1055–1062, 2014.

MASI, B.; PERLES-BARBACARU, T.A.; LAPRIE, C. *et al.* In vivo MRI Assessment of Hepatic and Splenic Disease in a Murine Model of Schistosomiasis. PLOS Neglected Tropical Diseases, 9, (9), sep 22, 2015.

MATOS-ROCHA, T.J.; CAVALCANTI, M.G.; BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* Ultrastructural study of morphological changes in *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to the monoterpene rotundifolone. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 50(1): 86-91, 2017.

MATOS-ROCHA, T.J.; CAVALCANTI, M.G.S.; VERAS, D.L. *et al.* Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after *in vitro* incubation with the essential oil of mentha x villosa. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 58:4, 2016.

MATOS-ROCHA, T.J.; LIMA, M.D.; SILVA, A.L. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 59: e8, 2017.

MELO, J.O.F.; DONNICI, C.L.; AUGUSTI, R. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. Quim. Nova, 29(3), 569-579, 2006.

MENDONÇA-SILVA, D.L.; NOVOZHILOVA, E.; COBBETT, P.J. *et al.* Role of calcium influx through voltage-operated calcium channels and of calcium mobilization in the physiology of *Schistosoma mansoni* muscle contractions. Parasitology, 133, 67–74, 2006.

MOORTHY, N.S.H.N.; CERQUEIRA, N.M.; RAMOS, M.J. *et al.* Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 8, 168-182, 2013.

MORAES, M.C.; CARDOSO, C.L. Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* for specific inhibition studies. Anal Bioanal Chem, 405:4871–4878, 2013.

MOREIRA, D.R.M.; OLIVEIRA, A.D.T.; GOMES, P.A.T.M. *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. European Journal of Medicinal Chemistry 75, 467 e 478, 2014.

MUDEPPA, D.G.; KUMAR, S.; KOKKONDA, S. *et al.* Topoisomerase II from Human Malaria Parasites: expression, purification, and selective inhibition. The Journal of Biological Chemistry, 290(33), pp. 20313–20324, August 14, 2015.

NAWARATNA, S.S.K.; GOBERT, G.N.; WILLIS, C. *et al.* Lysosome-associated membrane glycoprotein (LAMP) – preliminary study on a hidden antigen target for vaccination against schistosomiasis. Nature: scientificreports, vol. 5: article 15069, 2015.

NEVES, J.K.A.L.; LIMA, M.C.A.; PEREIRA, V.R.A. *et al.* Antischistosomal action of thioxoimidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. *Experimental Parasitology*, 128, 82–90, 2011.

OLIVEIRA, J.F.; LIMA, T.S.; VENDRAMINI-COSTA, D.B. *et al.* Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay, *Eur J Med Chem.* 136 (2017) 305-314. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.023.

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; ALMEIDA JUNIOR, A.S.A. *et al.* Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. *British Journal of Pharmaceutical Research* 7(6): 386-400, 2015.

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B. *et al.* Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 104, p. 148-146, 2015.

OLIVEIRA, R.N.; REHDER, V.L.; OLIVEIRA, A.S. *et al.* Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 139, 63–72, 2014.

OLVEDA, D.U.; OLVEDA, R.M.; MCMANUS, D.P. *et al.* The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. *International Journal of Infectious Diseases* 28, 193–203, 2014.

PATRA, M.; INGRAM, K.; PIERROZ, V. *et al.* Ferrocenyl Derivatives of the Anthelmintic Praziquantel: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 8790-8798, 2012.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Advances in Parasitology*, 6, pp. 233-90, 1968.

PEREIRA, A.C.; SILVA, M.L.A.; SOUZA, J.M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of (-)-6,6_-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 149, 195–201, 2015.

PEREIRA, H.M.; BERDINI, V.; FERRI, M.R. *et al.* Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor. *Acta Tropica* 114:97–102, 2010.

PEREIRA, V.R.; LORENA, V.M.; SILVA, A.P. *et al.* Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitology* 129:563–570, 2004.

PEREIRA, H.D.; FRANCO, G.R.; CLEASBY, A. *et al.* Structures for the Potential Drug Target Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni* Causal Agent of Schistosomiasis. *J. Mol. Biol.* 353, 584–599 2005.

PEREIRA, W.R.; KLOOS, H.; CRAWFORD, S.B. *et al.* Schistosoma mansoni infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: Analysis of exposure risk. *Acta Tropica* 113 , 34–41, 2010.

PERGAL, K.; PERGAL, M.; CSANADI, J.; DJOKOVIC, D. Synthesis of 5-arylidene-3-(4'-bromobenzyl) Thiazolidine-2,4-diones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 41, nº 12, 2005.

PITTA, M.G.R.; SILVA, A.C.A.; NEVES, J.K.A.L. *et al.* New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(Suppl. I): 313-316, 2006.

POHLMANN, A.R.; QUIRION, J.C; GUILLAUME, D. *et al.* Peptídeos de conformação restrita induzida pela incorporação de unidades (aza)lactâmicas. *Química Nova*, 22(6), 1999.

POPOV-PERGAL, K.; PERGAL, M.; CSANADI, J. *et al.* Synthesis of 5-arylidene-3-(4'-bromobenzyl)-thiazolidine-2,4-diones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 41(12), 2005.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M. *et al.* A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Brasília: Epidemiol. Serv. Saúde*. 17(3):163-175 p. jul-set 2008.

PROLE, D.L.; TAYLOR, C.W. Identification of Intracellular and Plasma Membrane Calcium Channel Homologues in Pathogenic Parasites. *PLoS ONE* 6(10):e26218. doi:10.1371/journal.pone.0026218, October 14, 2011.

QIN, Y.; XING, R.; LIU, S. *et al.* Novel thiosemicarbazone chitosan derivatives: Preparation, characterization, and anti fungal activity. *Carbohydrate Polymers* 87, 2664– 2670, 2012.

RAMIREZ, B.; BICKLE, Q.; YOUSIF, F. *et al.* S. Schistosomes: challenges in compound screening. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2 (Suppl. 1):S53–S61, 2007.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. 3.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIBEIRO, P.; PATOCKA, N. Neurotransmitter transporters in schistosomes: Structure, function and prospects for drug discovery. *Parasitology International*, 62, 629–638, 2013.

RUJENI, N.; MORONA, D.; RUBERANZIZA, E. *et al.* Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in Rwanda: an update on their epidemiology and control. *Infectious Diseases of Poverty*. 6:8, 2017.

SANCHEZ, M.C.; KRASNEC, K.V.; PARRA, A.S. *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 Negl Trop Dis 11(6): e0005691, 2017.

SANTIAGO, E.F.; OLIVEIRA, S.A.; OLIVEIRA FILHO, G.B. *et al.* Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58 (1), p. 352–363, 2014.

SANTOS, M.B.; SANTOS, A.D.; SILVA, P.P. *et al.* Spatial analysis of viral hepatitis and schistosomiasis coinfection in an endemic area in Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 50(3):383-387, 2017.

SANTOS, R.A.; BATISTA JUNIOR, J.; ROSA, S.I. *et al.* Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. Parasitology, Londres, v. 138, n. 10, p. 1224-1233, 2011.

SAVIOLI, L.; ALBONICO, M.; COLLEY, D.G. *et al.* Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty. Infectious Diseases of Poverty, 6:65, 2017.

SAYED, A.A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J. *et al.* Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. Nat Med. 14:407–412, 2008.

SCHOLTE, R.G.; GOSONI, L.; MALONE, J.B. *et al.* Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. Acta Tropica, 132, 57–63, 2014.

SHAKER, Y.; SAMY, N.; ASHOUR, E. Hepatobiliary Schistosomiasis. Journal of Clinical Translational Hepatology. vol. 2, 212–216, 2014.

SHARMA, M.; KHANNA, S.; BULUSU, G. *et al.* Comparative modeling of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: A multifunctional target for antischistosomal therapy. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 27, 665–675, 2009.

SHELKE, S.H.; MHASKE, P.C.; NANDAVE, M. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 3-aryl-2-(2-substituted-4-methylthiazole-5-yl)thiazolidin-4-one as possible anti-inflammatory and antimicrobial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters v.22, p. 6373–6376, 2012.

SHEN, J.; LAI, D.; WILSON, A. *et al.* Nitric oxide blocks the development of the human parasite *Schistosoma japonicum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 14(38):10214-10219, 2017.

SILVA, A.C.A.; NEVES, J.K.A.L.; IRMÃO, J.I. *et al.* Study of the Activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against Schistosomiasis *Mansoni* in Mice. The Scientific World Journal. 2012.

SILVA, A.L.; OLIVEIRA, J.F.; SILVA, W.L. *et al.* In vivo study of schistosomicidal action of 1-benzyl-4-[(4-fluoro-phenyl)-hydrazono]-5-thioxo-imidazolidin-2-one. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 502–507, 2016.

SILVA, K.E.R.; SILVA, R.M.F.; COSTA, S.P.M. *et al.* Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 33(1): 9-16, 2012.

SILVA-MORAES, V.; COUTO, F.F.; VASCONCELOS, M.M. *et al.* Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol. 108(5): 600-604, August 2013.

SILVEIRA, N.J.; UCHOA, H.B.; CANDURI, F. *et al.* Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.322, 100–104, 2004.

SINGH, S.P.; PARMAR, S.S.; RAMAN, K. *et al.* Chemistry and biological activity of thiazolidinones. *Chem Rev*; 81: 175-203, 1981.

SOLIMAN, M.F.M.; IBRAHIM, M.M. Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Tropica* 93, 1–9, 2005.

SONG, L.; LUO, H.; FAN, W. *et al.* Oxadiazole-2-oxides may have other functional targets, in addition to SjtGR, through which they cause mortality in *Schistosoma japonicum*. *Parasites & Vectors*, 9:26, 2016.

SPIVAK, A.Y.; KEISER, J.; VARGAS, M. *et al.* Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 6297–6304, 2014.

SWIERCZEWSKI, B.E.; DAVIES, S.J. Developmental regulation of protein kinase A expression and activity in *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 40, 929–935, 2010.

TENORIO, R.P.; GOES, A.J.S.; LIMA, J.G. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, 28(6), 1030-1037, 2005.

THOMAS, G. *Química medicinal: uma introdução*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

WANG, W.; LI, Q.; WEI, Y. *et al.* Novel carbazole aminoalcohols as inhibitors of b-hematin formation: Antiplasmodial and antischistosomal activities. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 7, 191 e 199, 2017.

WHO (2016). *Weekly epidemiological NOS*. 2016 World Health Organization, Geneva, Switzerland: 49/50, 9 December 2016. Acesso 04 Set 2017

WHO (2017) Schistosomiasis Fact sheet Updated January 2017 World Health Organization, Geneva, Switzerland: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> Acesso 04 Set 2017

WHO (2015) Schistosomiasis. World Health Organization, Geneva, Switzerland: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso 06/11/2015.

XIAO, S.H.; KEISER, J.; CHOLLET, J. *et al.* The in vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes on major human schistosome species. *Antimicrobial Agents Chemother.* 51: 1440–1445, 2007.

YANG, P.; YANG, Q.; QIAN, X. *et al.* Isoquino[4,5-bc]acridines: Design, synthesis and evaluation of DNA binding, anti-tumor and DNA photo-damaging ability. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 84: 221-226, 2006.

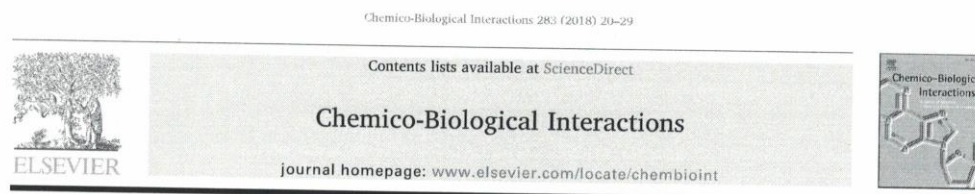
YONES, D.A.; BADARY, D.M.; SAYED, H.M.B. *et al.* Comparative Evaluation of Anthelmintic Activity of Edible and Ornamental Pomegranate Ethanolic Extracts against *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, Volume 2016.

YOU, H.; GOBERT, G.N.; DU, X. *et al.* Functional characterisation of *Schistosoma japonicum* acetylcholinesterase. *You et al. Parasites & Vectors* 9:328, 2016.

ZEVIKOVENE, A.; ZEVIKOVAS, A.; TARASEVICIUS, E. *et al.* Synthesis and *in vitro* Antimicrobial Study of 4-thiazolidinone containing sulfanilamide. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 69(5), pp. 911ñ915, 2012.

ZONI, A.C.; CATALÁ, L.; AULT, S.K. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942- 2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3): e0004493, 2016.

ANEXO A - New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of *in vitro* schistosomicidal activity and ultrastructural analysis



New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of *in vitro* schistosomicidal activity and ultrastructural analysis

Luana Maria Mariz Gomes da Silva^a, Jamerson Ferreira de Oliveira^b, Willams Leal Silva^b, Anekecia Lauro da Silva^b, Antônio Sérgio Alves de Almeida Junior^b, Victor Hugo Barbosa dos Santos^a, Luiz Carlos Alves^c, Fábio André Brayner dos Santos^c, Vladia Maria Assis Costa^d, André de Lima Aires^a, Maria do Carmo Alves de Lima^{b,*}, Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{b,**}

^a Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, 50740-465, Recife, PE, Brazil

^b Chemistry Laboratory and Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^c Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ) and Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, 50740-465, Recife, PE, Brazil

^d Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, 50740-600, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Benzodioxole
Schistosomicidal activity
Schistosoma mansoni
Scanning electron microscopy

ABSTRACT

Schistosomiasis is considered a serious public health problem in 78 countries and territories located in Africa, Asia and America and it is estimated in more than 249 million people infected by any of the species of *Schistosoma*. The exclusive use of praziquantel (PZQ), effective drug against all species of *Schistosoma*, has been the basis of the development of a possible resistance against the strains of this parasite. In addition, PZQ is not effective against young forms of worms. Thus, there is a need for the development of new drugs with schistosomicidal activity. The objective of this work was to synthesize and to evaluate the therapeutic potential of new benzodioxole derivatives (3–14) candidates for schistosomicidal drugs. All compounds synthesized showed *in vitro* schistosomicidal activity. The derivative 12 was considered the best compound, since it took 100% of worms to mortality in the first 72 h of exposure at the concentration of 100 µM and 83.3% at the concentration of 50 µM. Furthermore, male and female adult worms, incubated for 24 h with the compound 12 showed tegument damages characterized by extensive desquamation and edema, tuber destruction, bubble formation and exposure of the muscle layer. This compound has a restricted structure, where the thiazolidinone is attached to the 4-position of the 1,3-benzodioxol ring. The structural conformation of derivative 12 was probably responsible for the promising schistosomicidal activity, where the presence of an electron/conformational restriction of the thiazolidine ring, as well as the action of bromine as a bulk substitute, favored an increase in biological activity. In addition, tegumentary changes caused by derivative 12 may also have been responsible for the death of adult worms of *Schistosoma mansoni*. Therefore, we verified that the results obtained in this study make benzodioxole derivatives possible candidates for prototypes of new schistosomicidal drugs.

1. Introduction

Schistosomiasis is considered one of the most important neglected diseases. It is endemic in 78 countries and territories located in Africa, Asia and the Americas and it is estimated to be more than 249 million people infected with any of the *Schistosoma* species: *S. haematobium*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. mekongi*. Approximately 92% of the parasitized population inhabit sub-Saharan Africa, a region where schistosomiasis kills about 200,000 people

annually. Estimates show that at least 218 million people needed preventive treatment in 2015 as ways to reduce and prevent severe morbidity in highly endemic areas [1].

Praziquantel (PZQ), a pyrazinoisoquinolinic derivative, is the only alternative treatment for schistosomiasis and it is effective against all *Schistosoma* species, safe and with low cost [2–4]. However, PZQ does not act on immature forms of worms, and there are reports of resistant strains [5,6]. At the same time, there is no availability of other schistosomicidal drugs on the market with comparable efficacy to that of PZQ [7].

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: nenalima.maridocarmo@gmail.com (M.d.C.A. de Lima), jcmonica@globo.com (M.C.P.d.A. Albuquerque).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.016>

Received 26 October 2017; Received in revised form 24 December 2017; Accepted 18 January 2018
0009-2797 / © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Thus, the search for new drugs that may present activity against *Schistosoma* species becomes fundamental. Our group has explored the schistosomicidal potential of synthetic molecules on *S. mansoni*, among them benzodioxole derivatives, obtained by molecular hybridization of 1,3-benzodioxole, thiosemicarbazone and thiazolidinone nuclei.

1,3-benzodioxole is present in several drugs and has been used as an important intermediary in the organic synthesis both in the preparation of several biologically active natural products and in the preparation of synthetic substances originating from planned drug development programs [8,9]. Studies show that the thiosemicarbazones portion has antiparasitic activity [10,11]. Similarly, the thiazolidinone nucleus has also shown proven schistosomicidal activity [12]. Thus, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* schistosomicidal activity of benzodioxole derivatives against adult worms of *Schistosoma mansoni*.

2. Material and methods

2.1. Chemistry

IR spectra were recorded on potassium bromide pellets with a Bruker IFS-66 IR spectrophotometer (Bruker, USA). ^1H NMR spectra were recorded at 400 MHz on an Varian 400-MR spectrometer. ^{13}C NMR spectra were recorded at 100 MHz on an Varian, USA 400-MR spectrometer with tetramethylsilane as an internal standard and DMSO- d_6 as the solvent. Silica gel 60-N (spherical and neutral, 100–210 m, 37560-79), supplied by Kanto Chemical Co., was used for column chromatography. All melting points were measured on a Quimis-340.27 apparatus (Quimis, Diadema, SP, Brazil) and are uncorrected.

2.1.1. Synthesis and characterization of benzo[d][1,3]dioxole-5-carbaldehyde (2)

A solution of 3,4-dihydroxybenzaldehyde (5 g, 0.011 mol) in DMF (150 mL) was added dropwise to a suspension of CH_2Br_2 (31.4 mL, 16.7 mol) and K_2CO_3 (10 g, 0.0362 mol) in DMF (30 mL) according protocol to Wang et al. (2010) [13] with minor modifications. The mixture was stirred and heated at reflux for 24 h then cooled and filtered. The filtrate was concentrated, diluted with water, and extracted with ethyl acetate (3×100 mL). The filter cake was with ethyl acetate (25 mL). The organic layer was washed with 10% NaOH (25 mL), water (25 mL), dried (Na_2SO_4), and evaporated to afford 2 g (38%) as a yellow oil. The aldehyde was also obtained starting from the optimized piperonyl alcohol [14]. The reaction consists of the oxidation of alcohol (1 g, 0.0065 mol) with 15 equivalents of manganese IV oxide (8.55 g) in dry dichloromethane (15 mL) for 2 h at 25 °C. After 2 h, the obtained filtrate was evaporated under reduced pressure and taken to the freezer obtaining a crystalline precipitate in a yield of 85%. The benzo[d][1,3]dioxole-4-carbaldehyde was obtained commercially.

2.1.2. Synthesis and characterization of thiosemicarbazones (3–9)

Then an glacial acetic acid (1.5 mL) was added to a solution of benzo[d][1,3]dioxole-4-carbaldehyde (1) or benzo[d][1,3]dioxole-5-carbaldehyde (0.5 g, 0.0043 mol) (2) and the appropriate *N*-aryl-thiosemicarbazides (0.0043 mol) in absolute ethanol (40 mL). The condensation reaction was stirred under reflux for the appropriate time (TLC controlled). The solvent was evaporated under reduced pressure to afford the respective crude. After drying, the product was recrystallized from toluene [15].

2.1.2.1. 2-(benzo[d][1,3] dioxol-4-ylmethylene)-*N*-phenyl-thiosemicarbazone (3). Compound 3 was obtained as white powder (63%); $R_f = 0.55$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 192–193 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.00 (1H, s, NH); 10.12 (1H, s, NH); 8.26 (1H, s, -HC=); 7.71 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.61 (3H, m, Ar); 7.42 (2H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.95 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.86 (1H, t, Ar, $J = 8$ Hz); 6.11 (2H, s) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 101.54 (1C, CH_2);

109.3 (1C, Ar), 116.13 (1C, Ar), 118.4 (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 121.5 (1C, Ar), 125.3 (2C, Ar), 128 (2C, Ar), 136.2 (1C, Ar), 138.9 (1C, Ar), 146.53 (1C, Ar), 147.56 (1C, C=N), 175.86 (1C, C=S) ppm; IR (KBr cm^{-1}) 3307 (NH); 1543 (C=N); 1511 (C=S).

2.1.2.2. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)-*N*-(4-chlorophenyl)-thiosemicarbazone (4). Compound 4 was obtained as white powder (50%); $R_f = 0.60$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 220–221 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.01 (1H, s, NH); 10.12 (1H, s, NH); 8.2 (1H, s, -HC=); 7.7 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.61 (2H, d, Ar, $J = 6.4$ Hz); 7.4 (2H, d, Ar, $J = 6.4$ Hz); 6.94 (1H, d, Ar, $J = 7.6$ Hz); 6.87 (1H, t, Ar, $J = 8$ Hz); 6.11 (2H, s) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 101.54; (1C, CH_2); 109.37 (1C, Ar), 116.01 (1C, Ar), 118.33 (1C, Ar), 121.5; (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 127.31 (2C, Ar), 127.94 (2C, Ar), 129.30 (1C, Ar), 136.54 (1C, Ar), 146.63 (1C, Ar), 147.58 (1C, C=N), 175.87 (1C, C=S) ppm. IR (KBr, cm^{-1}) 3310 (NH); 1541 (C=N); 1506 (C=S).

2.1.2.3. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)-*N*-(4-bromophenyl)-thiosemicarbazone (5). Compound 5 was obtained as white powder (70%); $R_f = 0.60$ (*n*-Hex/AcOEt 7:3); mp: 216 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.00 (1H, s, NH); 10.10 (1H, s, NH); 8.26 (1H, s, -HC=); 7.70 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.55 (4H, s, Ar); 6.95–6.86 (2H, dd, Ar, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz); 6.11 (2H, d, CH_2) ppm. IR (KBr, cm^{-1}) 3300 (NH); 1541 (C=N); 1502 (C=S).

2.1.2.4. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-*N*-(4-chlorophenyl)-thiosemicarbazone (6). Compound 6 was obtained as white powder (35%); $R_f = 0.60$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 169–171 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.8 (1H, s, NH); 10.1 (1H, s, NH); 8.06 (1H, s, -HC=); 7.4 (2H, d, Ar, $J = 8.8$ Hz); 7.6 (2H, d, Ar, $J = 8.8$ Hz); 6.94 (1H, d, Ar, $J = 7.6$ Hz); 7.1 (1H, d, Ar, $J = 6.8$ Hz); 7.8 (1H, s, Ar); 6.0 (2H, d, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 101.6 (1C, CH_2); 109.37 (1C, Ar), 116.01 (1C, Ar), 118.33 (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 127.31 (2C, Ar), 127.94 (2C, Ar), 129.30 (1C, Ar), 136.54 (1C, Ar), 146.63 (1C, Ar), 155.9 (1C, C=N), 175.9 (1C, C=S) ppm. IR (KBr, cm^{-1}) 3294.2(NH); 1548 (C=N); 1497 (C=S).

2.1.2.5. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-*N*-(4-bromophenyl)-thiosemicarbazone (7). Compound 7 was obtained as white powder (60%); $R_f = 0.50$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 187 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.79 (1H, s, NH); 10.09 (1H, s, NH); 8.06 (1H, s, -HC=); 7.81 (1H, s, Ar); 7.55 (2H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.54 (2H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.15 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.94 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.08 (2H, s, CH_2) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 101.96 (1C, CH_2); 106.04 (1C, Ar), 108.63 (1C, Ar), 124.89 (1C, Ar), 128.16 (1C, Ar), 128.34 (1C, Ar), 128.93 (1C, Ar), 129.75 (2C, Ar), 138.55 (2C, Ar), 143.43 (1C, Ar), 148.52 (1C, Ar), 149.58 (1C, C=N), 176.16 (1C, C=S) ppm; IR (KBr, cm^{-1}) 3330 (NH); 1543 (C=N); 1498 (C=S).

2.1.2.6. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-*N*-(4-methoxyphenyl)-thiosemicarbazone (8). Compound 8 was obtained as white powder (60%); $R_f = 0.50$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 175–177 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.6 (1H, s, NH); 10.0 (1H, s, NH); 8.04 (1H, s, -HC=); 7.38 (2H, d, Ar, $J = 8.8$ Hz); 7.13 (2H, d, Ar, $J = 9.2$ Hz); 7.11 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.93 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.8 (1H, s, Ar); 6.06 (2H, s, CH_2); 3.34 (3H, s, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 55.2 (1C, CH_3); 101.4 (1C, CH_2); 105.5 (1C, Ar); 108.1 (1C, Ar); 113.1 (1C, Ar) 124.2 (1C, Ar); 127.7 (1C, Ar); 128.6 (2C, Ar); 132 (1C, Ar); 142.3 (1C, Ar); 148.05 (2C, Ar); 148.9 (1C, Ar); 156.9 (1C, C=N); 176.1 (1C, C=S) ppm. IR (KBr, cm^{-1}) 3316.7 (NH); 1542 (C=N); 1499 (C=S).

2.1.2.7. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-*N*-(naphthalen-1-yl)-thiosemicarbazone (9). Compound 9 was obtained as white powder (42%); $R_f = 0.62$ (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 213–214 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.8 (1H, s, NH); 10.3 (1H, s, NH); 8.12 (1H,

s, $-\text{HC} =$); 7.8 (3H, m, Ar); 7.5 (4H, m, Ar); 6.96 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.1 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.9 (1H, s, Ar); 6.06 (2H, d, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 101.4 (1C, CH_2); 105.5 (1C, Ar), 108.09 (1C, Ar), 123.4 (1C, Ar), 124.2 (1C, Ar), 125.3 (1C, Ar), 125.9 (1C, Ar), 125.9 (1C, Ar), 126.5 (1C, Ar), 126.8 (1C, Ar), 127.9 (1C, Ar), 128.7 (1C, Ar), 130.6 (1C, Ar), 133.6 (1C, Ar), 135.7 (1C, Ar), 142.3 (1C, Ar), 148.04 (1C, Ar), 148.9 (1C, C=N), 177.6 (1C, C=S). IR (KBr, cm^{-1}) 3310.3 (NH); 1550 (C=N); 1499 (C=S).

2.1.3. Synthesis and characterization of 4-thiazolidinones (10–14)

Then an was added 0.0017 mol of the required condensed intermediate, 0.0019 mol of ethyl chloroacetate (1.1 eq.), 0.0069 mol of anhydrous sodium acetate (4 eq.) and 25 mL of ethanol in a flask. The mixture was stirred under the same conditions at reflux temperature until completion of the reaction (18–96 h, monitoring by TLC). After wards, the final solution was cooled to room temperature and subsequently in an ice bath. After drying, the product was recrystallized from toluene [16].

2.1.3.1. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)hydrazono)-3-phenylthiazolidin-4-one (10). Compound 10 was obtained as white powder (45%): $R_f = 0.55$ (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 220 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.22 (1H, s, $-\text{CH} =$); 7.37–7.54 (5H, m, Ar); 7.24 (1H, d, Ar, $J = 7.2$ Hz); 6.99 (1H, d, Ar, $J = 7.6$ Hz); 6.90 (1H, t, Ar, $J = 8$ Hz); 6.09 (2H, s, CH_2); 4.09 (2H, s, CH_2) ppm; IR (KBr, cm^{-1}) 1589 (C=N); 1730 (C=O).

2.1.3.2. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)hydrazono)-3-(4-chlorophenyl)thiazolidin-4-one (11). Compound 11 was obtained as white powder (72%): $R_f = 0.50$ (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 221 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.24 (1H, s, $-\text{CH} =$); 7.73 (2H, d, Ar, $J = 9$ Hz); 7.38 (1H, d, Ar, $J = 8.4$ Hz); 7.24 (1H, d, Ar, $J = 7.8$ Hz); 6.99 (d, 1H, Ar, $J = 6.9$ Hz); 6.98 (1H, t, Ar, $J = 7.8$ Hz); 6.08 (2H, s, CH_2); 4.08 (2H, s, CH_2) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 32.38 (1C, CH_2); 101.68 (1C, CH_2); 110.08 (1C, Ar), 115.96 (1C, Ar), 119.16 (1C, Ar), 121.79 (1C, Ar), 121.83 (1C, Ar), 130.43 (2C, Ar), 132.05 (2C, Ar), 134.18 (1C, Ar), 146.68 (1C, Ar), 147.86 (1C, C=N), 151.89 (Cq), 165.56 (Cq); 171.83 (C=O) ppm; IR (KBr, cm^{-1}) 1591 (C=N); 1726 (C=O).

2.1.3.3. 2-benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylenehydrazono)-3-(4-bromophenyl)thiazolidin-4-one (12). Compound 12 was obtained as white powder (75%): $R_f = 0.60$ (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 239–240 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.24 (1H, s, $-\text{HC} =$); 7.57 (2H, d, Ar, $J = 12$ Hz); 7.42 (2H, d, Ar, $J = 12$ Hz); 7.25 (1H, d, Ar, $J = 10$ Hz); 7.0 (1H, d, Ar, $J = 10$ Hz); 6.8 (1H, t, Ar, 10 Hz); 6.09 (2H, s, CH_2); 4.08 (2H, s, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 32.3 (1C, CH_2); 101.6 (1C, CH_2); 109.37 (1C, Ar), 116.01 (1C, Ar), 118.33 (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 121.57 (1C, Ar), 127.31 (2C, Ar), 127.94 (2C, Ar), 129.30 (1C, Ar), 136.54 (1C, Ar), 146.63 (1C, Ar), 155.9 (1C, Ar), 175.9 (1C, C=O) ppm. IR (KBr, cm^{-1}) 1592 (C=N); 1543 (C=O).

2.1.3.4. 2-benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylenehydrazono)-3-(4-chlorophenyl)thiazolidin-4-one (13). Compound 13 was obtained as white powder (45%): $R_f = 0.60$ (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 248–249 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.22 (1H, s, $-\text{HC} =$); 7.57 (2H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.44 (2H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 7.28 (1H, s, Ar); 7.22 (1H, d, Ar, $J = 8$ Hz); 6.97 (1H, d, Ar, 8 Hz); 6.08 (2H, s, CH_2); 4.08 (2H, s, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 32.3 (1C, CH_2); 101.65 (1C, CH_2); 105.6 (1C, Ar), 108.5 (1C, Ar), 124.2 (1C, Ar), 128.3 (1C, Ar), 129.1 (1C, Ar), 130.1 (2C, Ar), 133.2 (2C, Ar), 133.8 (1C, Ar), 147.85 (1C, Ar), 149.7 (1C, Ar), 146.63 (1C, Ar), 149.7 (1C, C=N), 157.2 (1C, Ar), 164.2 (1C, C=N), 171.8 (1C, C=O). IR (KBr, cm^{-1}) 1590 (C=N); 1540 (C=O).

2.1.3.5. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)hydrazono)-3-(4-methoxyphenyl)thiazolidin-4-one (14). Compound 14 was obtained as white powder (70%): $R_f = 0.58$ (n-Hex/AcOEt 8:2); mp: 195–196 °C; ^1H

NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.22 (1H, s, $-\text{CH} =$); 7.21 (2H, d, Ar, $J = 8.4$ Hz); 7.27 (2H, d, Ar, $J = 8.4$ Hz); 7.04 (2H, d, Ar, $J = 8.8$ Hz); 6.98 (1H, d, Ar, $J = 7.6$ Hz); 6.08 (2H, s, CH_2); 4.06 (2H, s, CH_2); 3.8 (3H, s, OCH_3) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 32.13 (OCH_3); 55.39 (1C, CH_2); 101.63 (1C, CH_2); 105.63 (1C, Ar), 108.53 (1C, Ar), 114.25 (1C, Ar), 124.15 (1C, Ar), 127.55 (1C, Ar), 128.47 (2C, Ar), 129.34 (2C, Ar), 147.84 (1C, Ar), 149.65 (1C, C=N), 157.11 (Cq), 159.13 (Cq), 164.81 (Cq); 172.12 (C=O) ppm; IR (KBr, cm^{-1}) 1556 (C=N); 1602 (C=O).

2.2. Biological activity

2.2.1. In vitro cytotoxicity assay in HeLa cells (human cervical cancer epithelial cells)

Cytotoxicity assays were performed using HeLa cells. Cells in the exponential growth phase were collected by centrifugation and concentration of $4\text{--}5 \times 10^4/\text{mL}$ was created. 100 μL of the cell suspension was added to each well of a 96-well plate and cultured overnight at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO_2 . Benzodioxole derivatives (at 800, 400, 200, 100, 50, 25 and 12 μM) were added. Each concentration was assayed in triplicate, and control wells (no cells and no drugs) were assayed at the same time. The 'no cell' control wells only contained RPMI 1640 medium, MTT, DMSO and benzodioxole. The 'no drug' control wells contained the HeLa cells, RPMI 1640 medium, MTT and DMSO. The cells were cultured for 48 h at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO_2 . Then, 20 μL of 5 mg/mL MTT was added to each well and the culture conditions were maintained for 4 h. After this point, the medium was removed and 150 μL DMSO was added into each well to dissolve any crystallization. The value of absorbance at 570 nm of each well was measured with a microplate reader to assess the toxic effect of benzodioxoles on the vertebrate cells [17].

2.2.2. Obtainment of parasites and ethical considerations

In this study the *S. mansoni* strain BH (BH - Belo Horizonte, MG, Brazil) was used, which is routinely maintained at the Keizo Asami Immunopathology Laboratory of UFPE, through successive passages in mollusks of the genus *Biomphalaria glabrata* and Swiss webster mice (*Mus musculus*).

Mice with 30 days old weighing about 30 g (± 2 g) were infected percutaneously with about 120 cercariae of *S. mansoni*. After 45 days of infection, adult worms were recovered through perfusion of the hepatic portal system of mice [18]. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFPE (23076.046642/2014-81).

2.2.3. In vitro assay

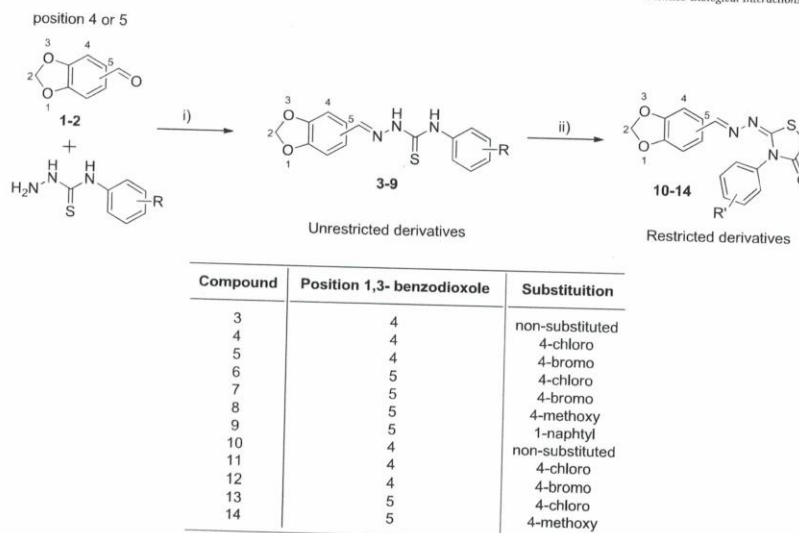
S. mansoni adult worms were recovered from mice were washed and transferred to culture dishes (2 couples of worms per well) containing 2 mL of RPMI-1640 medium plus 20 mM HEPES pH 7.5, penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 10% fetal bovine serum and then incubated at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO_2 .

After a 2 h period of adaptation to the medium, the benzodioxole derivatives were added to obtain concentrations of 200 μM , 100 μM , 50 μM and 25 μM from a stock solution of 1 mM in RPMI 1640 in 1.5% dimethyl sulfoxide (DMSO). As controls, pairs of *S. mansoni* adults were incubated in the presence of 1.5% DMSO in RPMI 1640 (negative control) or exposed to 10 μM PZQ (positive control).

All experiments were performed in quadruplicates and were repeated at least twice. The parasites were kept in culture for 5 days and monitored every 24 h and observed in the inverted optical microscope (BestScope BS-2090) for evaluation of motor activity, oviposition and mortality rate.

2.2.4. Schistosomicidal evaluation criteria

2.2.4.1. Motility and survival. An inverted microscope was used to evaluate the motility and survival of the worms, which were



Scheme 1. Synthesis of the target compounds. i) glacial acetic acid, ethanol, reflux and *N*-aryl-thiosemicarbazides (24–48 h); ii) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, CH_3COONa , EtOH, 24–48 h.

monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h of incubation. The motile and survival of the worms were evaluated according to the criterion of the viability scale proposed by Ramirez and collaborators (2007) [19] with some adaptations, using scores of 0–3 for each movement analyzed, being: score 3 for active worms with normal body movements; score 2 for slow worms with delayed body movements, and may only present movements of the anterior and posterior extremities; score 1 for very slow worms with occasional movement of the extremities or intestine and score 0 for still/dead worms with total absence of movement. The treatment was considered lethal when it was not possible to observe parasite movements for up to 2 min.

2.2.5. Scanning electron microscopy

For the ultrastructural analysis of the activity of benzodioxole derivatives against adult worms of *S. mansoni*, scanning electron microscopy (SEM) was used. After incubation at 50 μM and 100 μM for 24 h the worms were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 for further fixation in 0.1 M phosphate Buffer and 2.5% glutaraldehyde. Post-fixation was performed on 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 90 min. Then, three washes were carried out in 0.1 M phosphate buffer for further dehydration, using a growing series of 30%, 50%, 70%, 90% and 100% ethanol for 10 min each step. After dehydration, the critical point for the substitution of ethanol with carbon dioxide was obtained, drying the material for assembling the material in metallic stubs using a double carbon tape. The metallization was then performed by covering the material with a thin layer of gold for visualization and analysis on the scanning electron microscope JEOL JSM-5600 LV.

2.2.6. Statistical analysis

Numerical data were analyzed using Graphpad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla - CA, USA) software, and they are expressed as standard deviation (SD). Statistical differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) in association with the Turkey test for multiple simple-step comparisons. All the results were expressed as mean values of the groups $\pm$ standard deviations, and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Chemistry study

Unless noted otherwise, all commercially available reagents for obtaining compounds 3–9 and 10–14 were quantity from Aldrich® Chemical. The benzo-[d][1,3]-dioxol-4-carbaldehyde (1) was obtained in very low yields by the methods used. Thus, it was preferable to use the aldehyde obtained commercially. The benzo-[d][1,3]-dioxol-5-carbaldehyde (2) was initially obtained by an $\text{S}_{\text{N}}2$ nucleophilic substitution reaction between 3,4-dihydroxybenzaldehyde and dibromomethane. The formation of the derivative was confirmed by characteristic signs of ^1H NMR, represented by methylene hydrogens at δ 6 ppm in the form of a singlet, indicating the formation of the pentameric ring of aldehyde. The synthesis of aldehyde (2) was optimized using oxidation of piperonyl alcohol with a yield of 85%.

Derivatives 3–9 were obtained using a condensation reaction between aldehydes and thiosemicarbazides, previously described [15], as confirmed by ^1H NMR, where it was possible to observe the presence of hydrogens from the imine singlet ($\text{CH}=\text{N}$) at around 8 ppm and to identify IR bands corresponding to the thiocarbonyl group ($\text{C}=\text{S}$), imine ($\text{C}=\text{N}$) and NH [15].

Finally, 10–14 were obtained by way of cyclization of thiosemicarbazones and ethyl chloroacetate in basic medium, leading to the formation of the 4-thiazolidinone ring, as confirmed by the presence of ^1H NMR with singlet at 6 and 4 ppm corresponding to the methylenes of the benzodioxole and thiazolidinone rings, respectively [20]. The diagram of synthesis adopted to obtain the 1,3-benzodioxole derivatives can be demonstrated in Scheme 1.

3.2. In vitro effect of benzodioxole derivatives on adult worms of *S. mansoni*

Table 1 expresses the results of the schistosomicidal assay of benzodioxole derivatives against adult *S. mansoni* worms after 120 h of incubation. The results show that the compounds 5, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 were able to cause 100% worm mortality. The other compounds 3, 4, 6, 13 and 14, although not reaching 100% mortality, were able to

Table 1
Motility score of control worms, treated with Praziquantel (10 μ M) and with benzodioxole derivatives (120 μ M) after 120 h of incubation.

Treatments	Motility score of adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i> (%)			
	3	2	1	0
DMSO	100	–	–	–
PZQ	–	–	–	100
3	–	–	33.33	66.66
4	–	–	66.66	33.33
5	–	–	–	100
6	–	8.33	91.7	–
7	–	–	–	100
8	–	–	–	100
9	–	–	–	100
10	–	–	–	100
11	–	–	–	100
12	–	–	–	100
13	–	–	100	–
14	–	–	33.33	66.66

Score criteria: 3- active worms with normal body movements; 2- slow worms with delayed body movements, and may present only movements of the anterior and posterior extremities; 1- very slow worms, with occasional movement of the extremities or intestine; 0- real/dead worms with total absence of movement.

cause significant alterations in motility of adult worms.

Considering the maximum effect of 100% mortality after 120 h of exposure, we performed mortality kinetics every 24 h for 5 consecutive days using lower concentrations (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M and 25 μ M).

According to Table 2, the benzodioxole compounds **10** and **12** achieved 100% mortality in the first 72 h of exposure at the concentration of 200 μ M. However, the compound **12**, at this same time interval, led to 100% mortality at the concentration of 100 μ M and 83.3% at the concentration of 50 μ M.

The other selected derivatives also presented schistosomicidal potential, being dependent on time and concentration. At the concentration of 100 μ M, it was possible to observe that the compound **5** reached 100% worm mortality in 96 h, while the compounds **9** and **11** were able to cause 100% mortality of worms in 120 h. At the concentration of 50 μ M, the compounds **7** and **10** promoted 75% mortality in 96 h while the compound **5** achieved this same schistosomicidal effect in 120 h.

The worms in contact with the PZQ (positive control) showed total absence of their movements in the first 24 h of observation, while the worms in contact with RPMI and DMSO medium (negative control) were active with normal body movements throughout the experiment 120 h.

In relation to cytotoxicity assay, benzodioxole derivatives with the best schistosomicidal effects (**5**, **8**, **9**, **10**, **11** and **12**) showed IC_{50} values ranging from 45.77 μ M to 163 μ M (Table 2). Among these derivatives, the compound **12** was chosen for further tests because it presented the best schistosomicidal activity.

3.3. Ultrastructural damage of *S. mansoni* adult worms treated with the compound **12**

The compound **12** was evaluated for its potential to cause ultrastructural alterations in the integument of *S. mansoni* adult worms. Compared to the other derivatives, it was shown to be the most effective in causing the death of worms in the shortest time interval.

Worms incubated with compound **12** at concentrations of 50 μ M and 100 μ M were used. The analysis took place in 24 h, at which time a significant change in the motility of the worms was observed, without them being dead.

Scanning electron microscopy (SEM) revealed ultrastructural damage of the membrane surface exposed to the compound **12**, compared to the negative (untreated) and positive control (exposed to Praziquantel).

Worms incubated for 24 h in a supplemented RPMI 1640 medium and 1.5% DMSO showed intact surface structure and topography (Fig. 1 A1–

B3). The surface of male schistosomes displayed the gynecophoral canal (CG) (Fig. 1 A1), a longitudinal fold in the middle and posterior body that houses the female for the purpose of mating and reproduction. The anterior portion is characterized by oral sucker (OS) and ventral sucker or acetabulum (VS) (Fig. 1 A2). At a higher magnification of the mid-dorsal region of the worms a large number of tubercles (Tu) were observed (Fig. 1 A3); the surface of female schistosomes displayed cylindrical body (Fig. 1 B1), oral sucker (OS) and ventral sucker or acetabulum (VS) (Fig. 1 B2) and smooth tegument (ST) (Fig. 1 B3).

The *in vitro* effects of PZQ (10 μ M) on adult male and female worms caused an obvious contraction of longitudinal muscles, resulting in evident curvature and shortening of the worms (Fig. 2 A and C). Adult male worms were marked by evident severe lesions that included tubercle collapse, loss of spicules, blistering over the surface of the tegument (B) and the appearance of holes and bubble rupturing on the tegument (arrow) (Fig. 2B).

In adult female worms, besides the evident longitudinal contraction, it was possible to observe contraction of the circular musculature causing formation of rings that are shown in varied sizes (arrows) and disappearance of wrinkles (Fig. 2C and D). At higher magnification it is possible to observe various blisters distributed throughout the body (B) and the formation of edema in the integument (S) (Fig. 2D).

Fig. 3 shows male (Fig. 3 A1–B4) and female (Fig. 3 C1–D4) worms incubated for 24 h with compound **12** at concentrations of 50 (A1–A4 and C1–C4) and 100 μ M (B1–B4 and D1–D4). At both concentrations deep changes in the surface of the worms were observed result of the destruction of the integument in all worms examined. Although the characteristics of the tegumentary lesions were similar, it was possible to visualize larger damages in the highest concentration analyzed.

In Fig. 3 A1 and B2 an extensive tegumental destruction (TD) with bubbles (arrows) and erosion areas (arrow head) is observed in the anterior portion of male worms. At the concentration of 100 μ M there is also disintegration at the edge of the ventral suction cup (D) and the presence of bubbles (arrows). In addition, in the proximal posterior portion, it is evident the tegumental destruction with loss of tubers (TD) and numerous bubbles (arrows) (Fig. 3 B2). Figure A2 (terminal portion) and figures A3 and B3 (middle portion) depict the tegumental destruction of the male worm (TD) showing loss of tubers, spines and parallel folds. At the concentration of 50 μ M, figure A2, it is possible to observe areas with swelling (S) and agglomerated tubers (AT). At higher magnification, Figures A4 and B4 show severe alterations in the tegument characterized by tuber disintegration (D) and erosion of the integument (arrowhead) that resulted in basement membrane exposure.

In the female worms the integument appeared rough throughout its length (Fig. 3C1 and D2). At higher magnification, Fig. 3C2 and D3 and Fig. 3 C3–4 and D4 show alterations characterized by extensive desquamation (SL), bubbles (arrows) and areas with erosions in the posterior and middle regions (arrowhead), respectively. It is also possible to observe, in the concentration of 100 μ M, focal areas with apparent swelling (S) with fusion of tegumental wrinkles (Fig. 3 D1–2).

4. Discussion

4.1. *In vitro* effect of benzodioxole derivatives

Chemotherapy is the main strategy to control schistosomiasis, and praziquantel is the only drug of choice in the treatment of this parasitic disease [21,22]. However, besides PZQ being inactive against immature forms of *S. mansoni* worms, several treatment failures have been reported. In addition, the development of PZQ-resistant strains is imminent due to frequent exposure in mass treatment campaigns and the long period of use in the market [23–25]. Thus, it is imperative to develop research that may point to the discovery of new drugs with schistosomicidal activity.

Some studies have reported the importance of the pharmacophore nuclei that form the benzodioxole derivatives (thiosemicarbazone,

Table 2
Schistosomicidal activity against adult worms of *Schistosoma mansoni* and cytotoxicity against HeLa cells of benzodioxole derivatives.

Compounds	Time (h)	Concentration (μM)				Biological changes throughout the experiment	IC ₅₀ (μM)
		200	100	50	25		
Mortality (%)							
5	24	0	0	0	0	No pairing, non-adherent suction cups, absence of eggs, blisters, darkening and folding of worms.	163 ± 9.6
	48	0	0	0	0		
	72	50	33.3	0	0		
	96	91.7	100	16.7	41.7		
	120	100	100	75	66.7		
7	24	0	0	0	0	Inability of pairing, non-adherent suction cups, absence of eggs, bubbles.	118.3 ± 3.09
	48	0	0	0	0		
	72	50	16.7	16.7	0		
	96	91.7	58.3	75	0		
	120	100	66.7	75	0		
8	24	0	0	0	0	Inability of pairing, non-adherent suction cups, absence of eggs, bubbles.	156.4 ± 2.79
	48	41.7	0	0	0		
	72	66.7	0	0	0		
	96	100	50	0	0		
	120	100	83.3	0	0		
9	24	0	0	0	0	Inability of pairing, non-adherent suction cups, absence of eggs, bubbles.	123.4 ± 2.78
	48	0	0	0	0		
	72	58.3	83.3	0	0		
	96	100	91.7	66.7	91.7		
	120	100	100	100	100		
10	24	25	0	0	8.3	Inability of pairing, non-adherent suction cups, absence of eggs, bubbles.	159.6 ± 4.25
	48	100	25	0	16.7		
	72	100	33.3	33.3	16.7		
	96	100	58.3	75	41.6		
	120	100	75	75	58.3		
11	24	0	0	0	0	Inability of pairing, non adherent suckers, absence of eggs, blisters, exposure of muscle fibers.	60.71 ± 3.83
	48	0	0	0	0		
	72	50	8.3	0	0		
	96	91.7	50	16.7	0		
	120	100	100	25	0		
12	24	0	0	0	0	Inability of pairing, non adherent suckers, absence of eggs, blisters, exposure of muscle fibers.	45.77 ± 3.63
	48	0	0	0	0		
	72	100	100	83.3	0		
	96	100	100	83.3	25		
	120	100	100	83.3	50		

Note: 1 - During all observation interval the drug-free adult *S. mansoni* worms (negative control group) displayed peristaltic movements with characteristic waves throughout the whole body, suckers in constant movement and occasionally adhering to the bottom of the culture plate and without apparent morphological change. 2 - PZQ (positive control group) cause immediate reduction of motility, leaving them clearly shortened and after 24 h of exposure, 83.3% the worms had lost movement completely.

thiazolidinedione and 1,3-benzodioxole) as potential schistosomicidal agents. As an example we can mention the work of Espindola et al. (2015) [26] with thiosemicarbazone analogues, which were able to inhibit the cruzain protease, a protease belonging to the cysteine protease family and which plays a key role in the invasion, differentiation and proliferation of parasites in cells of the host. Likewise, Santiago et al. (2014) [27] demonstrated the importance of the thiazole nucleus in promoting *in vitro* 100% mortality of *S. mansoni* adult worms and stimulating the production of nitric oxide and TNF- α , indicating their participation in immunomodulatory activity.

According to Gupta et al. (2016) [28] the benzodioxole ring is a potential nucleus that must be explored in its antitumor, antibacterial, antifungal, antiparasitic and antioxidant activities. In addition, Barreiro et al. (2001) [9] reported that the 1,3-benzodioxole sub-unit of safrole is capable of interacting with receptors, characterizing this natural product as a potential raw material for drug prototype.

The cytotoxic activity of the benzodioxole derivatives in culture of HeLa cells presented IC₅₀ values greater than 100 μM with the exception of the compounds 11 and 12 derivatives as shown in Table 2. Similar IC₅₀ value for PZQ against the same cell line was determined by Patra et al. (2012) [29].

Although all the benzodioxole derivatives evaluated showed schistosomicidal activity, the compound 12 was the one that in the shortest time killed 100% of the worms, nevertheless it was the one that presented the lowest IC₅₀ showing to be the derivative with greater cytotoxic effect in HeLa cells. However, reported *in vitro* cytotoxicity results

do not necessarily have repercussions on *in vivo* toxicity assays. Oliveira et al. (2017) [30], when studying compounds with antiproliferative activity, demonstrated that the most potent derivative of the series despite being the most cytotoxic against the HaCat (immortalized human keratinocyte) strain, did not present serious clinical side effect when evaluated in acute toxicity.

In this study, benzodioxole derivatives were able to lead to mortality of *S. mansoni* worms, as well as alter motile parameters, promote changes in the integument, cause unmovability and inhibit oviposition thus showing the potential of these derivatives as a prototype of schistosomicidal drugs. All the benzodioxole derivatives tested were able to provoke unhooking of the worms and when this occurs, there are biochemical and physiological changes mainly in female worms, which are represented by the atrophy of the ovary, the yolk gland and the diminution of the corporal size of the worm [31]. Likewise, changes in the integument caused by benzodioxole derivatives contribute to its potential as a prototype schistosomicide drug, since the integument is essential for the survival of *S. mansoni* worms, being involved in processes of nutrient absorption and secretion of products, as well as protection against the immune response of the host [32].

On the other hand, when evaluating the benzodioxole derivative through their chemical structures, we observed that some molecules have conformational constraints, a factor that may allow the development of structure-activity relationship studies [33].

The introduction of conformational constraints such as formation of *N*-methylated chains, incorporation of double bonds or substitution

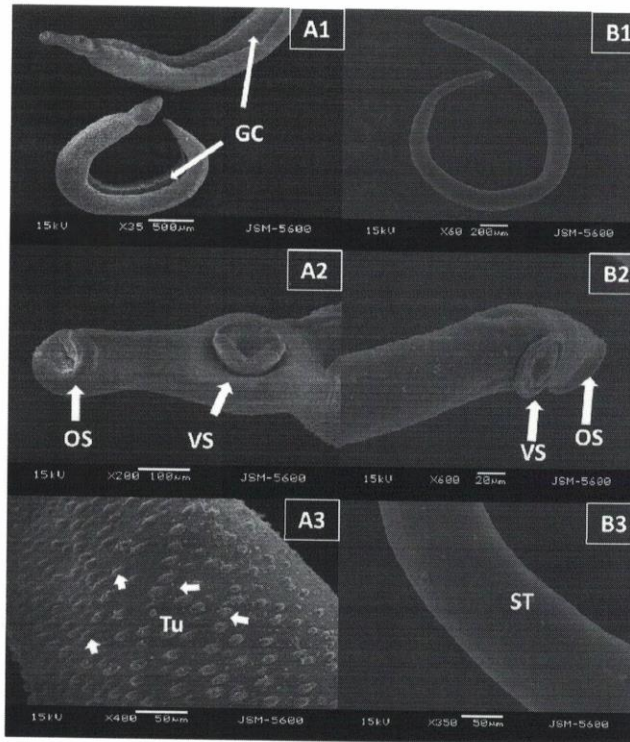


Fig. 1. (A1–B3) Scanning electron micrographs of male (A1–A3) and female (B1–B3) *S. mansoni* adult worms in a supplemented RPMI 1640 medium and 1.5% DMSO showing intact surface structure and topography; (A1, 35x) Surface of male schistosome presenting gynecophoric canal (GC) (A2, 200x) Anterior portion characterized by oral sucker (OS) and ventral sucker or acetabulum (VS); (A3, 400x) At a higher magnification of the mid-dorsal region of the worms a large number of tubercles (Tu); (B1, 60x) Surface of female *S. mansoni* worms, where a cylindrical body was identified; (B2, 600x) Ventral sucker (VS) and oral sucker or acetabulum (OS) and (B3, 350x) smooth tegument of female worms (ST).

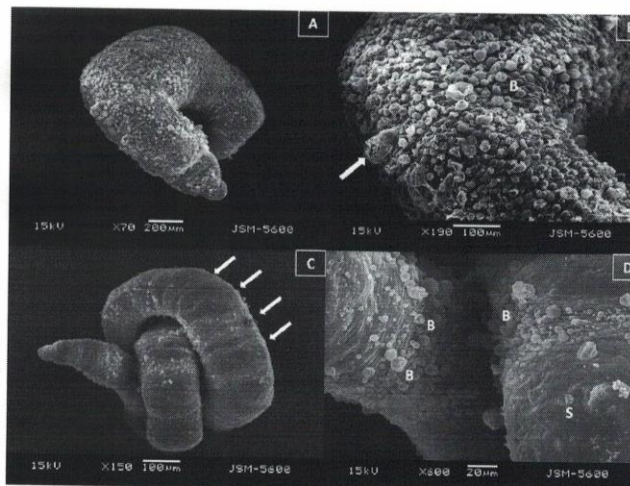


Fig. 2. (A–D) Scanning electron micrographs of male and female *S. mansoni* adult worms treated with PZQ (10µM): Contraction of longitudinal muscles, resulting in evident curvature and shortening of male (A, 70x) and female worms (C, 150x); (B, 190x) Adult male worms showing severe lesions, including tubercle collapse, loss of spicules, blistering over the surface of the tegument (B) and the appearance of holes and bubble rupturing (arrow); (C, 150x) Contraction of the circular musculature causing formation of rings that are shown in varied sizes (arrows) and disappearance of wrinkles; (D, 600x) At a higher magnification various blisters distributed throughout the body (B) and the formation of edema in the integument (S).



Fig. 3. (A1-D4) Scanning electron micrographs of male (A1-B4) and female (C1-D4) *S. mansoni* worms incubated for 24 h with compound 12 at concentrations of 50 (A1-A4 and C1-C4) and 100 μ M (B1-B4 and D1-D4); (A1, 200x; B2, 300x) extensive tegumental destruction (TD) with bubbles (arrows) and erosion areas (arrow head) is observed in the anterior portion of male worms; (B2, 300x) At the concentration of 100 μ M there is also disintegration at the edge of the ventral suction cup (D), the presence of bubbles (arrows) and in the proximal posterior portion, it is evident the tegumental destruction with loss of tubers (TD) and numerous bubbles (arrows); Terminal portion (A2, 250x) and middle portion (A3, 200x and B3, 300x) showing loss of tubers, spines and parallel folds; (A2, 250x) At the concentration of 50 μ M it is possible to observe areas with swelling (S) and agglomerated tubers (AT); (A4, 500x and B4, 650x) At a higher magnification severe alterations in the tegument characterized by tuber disintegration (D) and erosion of the integument (arrowhead) that resulted in basement membrane exposure were identified; (C1, 120x and D2, 35x) Rough Integument of female worms throughout its length; (C2, 700x and D3, 550x) and (C3, 900x; C4, 1,500x and D4, 1,000x) At a higher magnification alterations characterized by extensive desquamation (SI), bubbles (arrows) and areas with erosions in the posterior and middle regions (arrowhead, respectively; (D1, 500x and D2, 35x) In the concentration of 100 μ M, focal areas with apparent swelling (S) with fusion of tegumental wrinkles.

clusters, may be able to promote potentiation of the pharmacological activity by stabilization of the molecule, increase in affinity and selectivity, besides providing information about the needs topography of the receptors [33]. In addition, recent studies have demonstrated the possibility of using spacer groups with a certain degree of conformational restriction as a strategy for the design of new drugs. The preparation of *N*-acylhydrazones and thiosemicarbazones with a higher degree of conformational restriction, for example, led to the production of compounds with increased antiparasitic activity [34].

As regards the influence of the substitution on the *p*-phenyl unit, we can first consider the compounds 4 and 5, which are unrestricted compounds, substituted in the 4-position of the 1,3-benzodioxole ring. Compound 4 was able to cause mortality of only 33.33% of worms in the concentration of 200 μ M in 120 h, although it was responsible for a significant reduction in motility (66.66%). In comparison, the compound 5 promoted 100% mortality of worms at a concentration of 100 μ M in 96 h. This demonstrates that bromine substitution enhances schistosomicidal activity as compared to substitution with chlorine at the *p*-phenyl position.

Also with respect to the influence of substitution on the *p*-phenyl unit, the same fact is observed when comparing the compounds 11 and 12. These compounds are restricted, substituted at the 4-position with respect to the 1,3-benzodioxole ring. Both were able to cause 100% worm mortality at 100 μ M concentration, but the compound 12 took less time to achieve this effect.

In addition to the influence of substitution on the *p*-phenyl unit, we should consider the contribution of the binding position of the thiosemicarbazone or thiazolidinone nuclei to the 1,3-benzodioxole ring. Both compounds 5 and 7 are unrestricted molecules, substituted with bromine at the *p*-phenyl position. However, due to the binding position of the thiosemicarbazone to the 1,3-benzodioxole ring, these molecules

gave different results, with the most active compound 5 compared to compound 7.

Another example of the influence of the 1,3-benzodioxole ring binding position on schistosomicidal activity would be demonstrated by compounds 11 and 13. Both are restricted, isomeric molecules, substituted with chlorine at the *p*-phenyl position. However, compound 11 when substituted at the 4-position with respect to the 1,3-benzodioxole ring was much more active compared to the compound 13, since it did not cause worms to die during the note.

Finally, a factor that had great importance in the presentation of *in vitro* schistosomicidal activity of benzodioxole derivatives was the presence or absence of conformational restriction. Compounds 3 and 10 are unsubstituted benzodioxole derivatives on the *p*-phenyl ring, and substituted at the 4-position of the 1,3-benzodioxole ring. However, the compound 10, as a function of the conformational restriction represented by the thiazolidine ring, was effective in promoting a higher percentage of mortality in a shorter time.

It is interesting to note that in compounds substituted at the 5-position of the 1,3-benzodioxole unit, the presence of conformational restriction promotes less promising results when compared to unrestricted molecules. This can be observed in the results presented by the compounds 8 and 14. Both are derivatives substituted at the 5-position of the 1,3-benzodioxole ring and both have the methoxy group, which in addition to facilitating interaction with the receptor because it is bulky, also has anti-parasitic effect previously demonstrated in the literature by Pitta et al. (2006) [35]. However, compound 8 presented schistosomicidal activity superior to compound 14.

Thus, restricted molecules with substitution at the 4-position of the 1,3-benzodioxole ring show better schistosomicidal activity compared to restricted 5-substituted 1,3-benzodioxole ring molecules. At the same time, unrestricted molecules with substitution at the 5-position of the

1,3-benzodioxole ring show better schistosomicidal activity than restricted 5-substituted 3-benzodioxole ring molecules.

This is due to the fact that compounds substituted at the 5-position without conformational restriction may assume conformation that favors the interaction, since the molecule is less rigid, as observed with compounds 7, 8 and 9. On the other hand, the stiffness of the molecule represented by the presence of conformational restraints in compounds substituted in the 4-position of the 1,3-benzodioxole ring presents greater benefits, increasing the schistosomicidal activity, as observed in the results presented by the compounds 10, 11 and 12. In addition, the volume and electron effects of substituents on the para position of the phenyl ring, such as the methoxy group, the naphthyl group and halogens such as bromine and chlorine, may also influence the activity.

Thus, derivatives having the best schistosomicidal activity were mostly substituted compounds at the 4-position of the 1,3-benzodioxole ring (compounds 10, 11 and 12) and unsubstituted position 5 of the 1,3-benzodioxole ring (compounds 7, 8 and 9). The exceptions were represented by the benzodioxole compounds 5 (unrestricted and substituted at the 4-position of the ring) and 6 (unrestricted and substituted at the 5-position of the ring), which presented non-standard results due to the electronic effects caused by the substituents *p*-bromophenyl (higher activity) and *p*-chlorophenyl (lower activity), respectively.

4.2. Ultrastructural changes of *S. mansoni* adult worms

The tegument of adult worms of *S. mansoni* is an important biological target of schistosomicidal drugs, since it is a protective layer responsible for nutrient absorption, secretory functions and parasite protection [36]. Thus, ultrastructural changes in the surface of the integument have been used as an important parameter to be evaluated in schistosomicidal drug tests [37].

Male and female adult worms, incubated for 24 h with the compound 12 showed tegument damages characterized by extensive desquamation and edema, tuber destruction, bubble formation and exposure of the muscle layer. These changes were similar to those seen in *Schistosoma mekongi* adults treated with Artesunate [38], in *Schistosoma haematobium* treated with Atorvastatin combined with medroxyprogesterone acetate [39], and in *S. mansoni* treated with thiosemicarbazone and thiazole derivatives [27], Miltefosine [40], (Z)-1-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-5-thioxo-4-[(4-chloro-phenyl)-imidazolidin-2-one (LPSF/PTS23) [31], 1-benzyl-4-[(4-chloro-phenyl)-hydrazono]-5-thioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT-05) [6] e Primaquine [37]. Thus, we suggest that the schistosomicidal effect caused by LqIT/NW-05 may be associated with the action on the surface of the tegument of the worms.

Although the characteristics of the tegumentary lesions were similar in the concentrations of 50 and 100 µM of compound 12, it was possible to visualize greater damages in the higher concentration. This finding is in agreement with studies that investigated ultrastructural alterations caused by natural or synthetic compounds with schistosomicidal potential, such as extracts of pomegranate leaves [41], *Mentha x villosa* essential oil [42], Mefloquine [43] and β-lapachone [22].

The presence of phenyl and halogen groups in the structure of benzodioxole compounds allows increased absorption through cell membranes [44]. On this aspect, such clusters could be directly involved with the schistosomicidal effect of compound 12. Our hypothesis is corroborated by the results presented by Brandão et al. (2004) [45], Matos-Rocha et al. (2017) [46], Albuquerque et al. (2005) [47] and Albuquerque et al. (2007) [48], who verified that imidazolidine derivatives having halogen groups were able to provoke ultrastructural changes in the integument of *S. mansoni* adult worms.

Although the mechanism by which benzodioxole derivatives exert schistosomicidal activity *in vitro* has not yet been elucidated, tegumentary changes caused by compound 12 may have altered the metabolism of worms by interfering with vital activities such as nutrient uptake, metabolic secretion and suppression of the immune response.

5. Conclusions

Our results demonstrate that benzodioxole derivatives present *in vitro* schistosomicidal activity against *S. mansoni* adult worms, with significant reduction of motility, changes in tegument and mortality of worms. The compound 12, in particular, presented the best results for the schistosomicidal activity, and could be considered a potential prototype compound for the development of new schistosomicidal drugs.

Conflicts of interest

Authors have declared that no conflict interests exist.

Acknowledgements

This work was supported by the Foundation for Research Support of the State of Pernambuco (FACEPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination of Personal Development of Higher Education (CAPES).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.016>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.016>.

References

- [1] WHO, Schistosomiasis Fact Sheet Updated January 2017, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2017; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>, Accessed date: 4 September 2017.
- [2] A.F. Fakahany, M.S. Younis, A.M.S. El Hamshary, M.A.H. Fouad, M.A.E. Hassan, H.S.M. Ali, Effect of mefloquine on worm burden and tegumental changes in experimental *Schistosoma mansoni* infection, J. Microsc. Ultrastruct. 2 (2014) 7–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2014.03.001>.
- [3] L. Savioli, M. Albonico, D.G. Colley, R. Correa-Oliveira, A. Fenwick, W. Green, N. Kabatereine, A. Kabore, N. Katz, K. Klohe, P.T. Loverde, D. Rollinson, J.R. Stothard, L.T. Tchuente, J. Waltz, X. Zhou, Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty, Infect. Diseases. Poverty 6 (2017) 65, <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-017-0280-8>.
- [4] T. Frezza, M.P. Gremião, E.M. Zanotti-Magalhães, L.A. Magalhães, A.L. Souza, S.M. Allegretti, Liposomal-praziquantel: efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay, Acta Trop. 128 (2013) 70–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.011>.
- [5] M.S. Ferreira, R.N. Oliveira, D.N. Oliveira, C.Z. Esteves, S.M. Allegretti, R.R. Catharino, Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: an expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*, Int. J. Parasitol. 45 (2015) 385–391, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.008>.
- [6] J.K.A.L. Neves, M.C.A. Lima, V.R.A. Pereira, C.M.L. Melo, C.A. Peixoto, I.R. Pitta, Antischistosomal action of thioxoimidazolidine compounds: an ultrastructural and cytotoxicity study, Exp. Parasitol. 128 (2011) 82–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.021>.
- [7] N. Loruswannarat, N. Saowakon, P. Ramasoota, C. Wanichanon, P. Sobhon, The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*, Exp. Parasitol. 133 (2013) 18–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.003>.
- [8] P.R.R. Costa, Safról e Eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados, Quím. Nova 23 (2000) 3, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000300013>.
- [9] E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, C.R. Rodrigues, A.L.P. Miranda, Estratégias em química medicinal para o planejamento de fármacos, Rev. Bras. Ciências Farm. 37 (3) (2001) 269–292.
- [10] A.C. Silva, T.A.R. Santos, I.V.B. Silva, M.V.G. Oliveira, D.R.M. Moreira, A.C.L. Leite, V.R.A. Pereira, Aryl thiosemicarbazones: *in vitro* and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*, Exp. Parasitol. (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.003>.
- [11] E.A. Britta, A.P.B. Silva, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, C.C. Silva, R.L. Sernaglia, C.V. Nakamura, Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from Limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*, PLoS One 7 (2012) e41440, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041440>.
- [12] J.F. Oliveira, A.L. Silva, A.S.A. Almeida-Junior, E.F. Santiago, S.A. Oliveira, V.B.R. Silva, A.C. Silva, A.F. Barros, V.R.A. Pereira, I.R. Pitta, M.C.A. Lima,

- Synthesis and evaluation of the schistosomicidal and trypanocidal properties of thioxo imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-diones, Br. J. Pharmaceut. Res. 7 (2015) 386–400, <http://dx.doi.org/10.9734/BJPR/2015/18983>.
- [13] M. Wang, M. Gao, K.D. Miller, G.W. Sledge, G.D. Hutchins, Q.H. Zheng, Synthesis of carbon-11-labeled casimiroin analogues as new potential PET agents for imaging of quinone reductase 2 and aromatase expression in breast cancer, Steroids 75 (2010) 967–973, <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.06.004>.
 - [14] G. Tojo, M. Fernandez, Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids: a Guide to Current Common Practice, Springer, New York, 2006.
 - [15] J.F. Oliveira, A.L. Silva, D.B. Vendramini-Costa, C.A. Amorim, J.F. Campos, A.G. Ribeiro, R.O. Moura, J.L. Neves, A.L.T. G. Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima, Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities, Eur. J. Med. Chem. 104 (2015) 148–156, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.036>.
 - [16] A. Benmohammed, O. Khoumeri, A. Djafri, T. Terme, P. Vanelle, Synthesis of novel highly functionalized 4-thiazolidinone derivatives from 4-phenyl-3-thiosemicarbazones, Molecules 19 (2014) 3068–3083, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19033068>.
 - [17] L. Song, H. Luo, W. Fan, G. Wang, X. Yin, S. Shen, J. Wang, Y. Jin, W. Zhang, H. Gao, Q. Liu, W. Wang, B. Feng, C. Yu, Oxadiazole-2-oxides may have other functional targets, in addition to S1TGR, through which they cause mortality in *Schistosoma japonicum*, Parasites Vectors 9 (2016) 26, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1301-3>.
 - [18] R.H. Duvall, W.B. Dewitt, An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals, Am. J. Trop. Med. Hyg. 16 (1967) 483–486, <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.483>.
 - [19] B. Ramirez, Q. Bickle, F. Youssif, F. Fakorede, M.A. Mourise, S. Nwaka, Schistosomes: challenges in compound screening, Expert Opin. Drug Discov. 2 (2007) S53–S61, <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S53>.
 - [20] A. Benmohammed, O. Khoumeri, A. Djafri, T. Terme, P. Vanelle, Synthesis of NovelHighly functionalized 4-thiazolidinone derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones, Molecules 19 (2014) 3068–3083, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19033068>.
 - [21] A.C.A. Silva, J.K.A.L. Neves, J.I. Irmão, V.M.A. Costa, V.M.O. Souza, P.L. Medeiros, E.C. Silva, M.C.A. Lima, I.R. Pitta, M.C.P.A. Albuquerque, S.L. Galdino, Study of the 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against schistosomiasis mansoni in mice, Sci. World J. (2012), <http://dx.doi.org/10.1100/2012/2/20524>.
 - [22] A.L. Aires, E.C.P.A. Ximenes, R.A.R. Silva, V.X. Barbosa, A.J.S. Goes, C.A. Peixoto, V.M.O. Souza, M.C.P.A. Albuquerque, Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms, Exp. Parasitol. 142 (2014) 83–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.010>.
 - [23] H.M. Pereira, V. Berdini, M.R. Ferri, A. Cleasby, R.C. Garratt, Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor, Acta Trop. 114 (2010) 97–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.010>.
 - [24] R.E. Ewaisha, M. Bahey-el-din, S.F. Mossallan, E.I. Amer, H.M. Abousheib, A.M. Khalil, Combination of the two schistosomal antigens Sm14 and Sm29 elicits significant protection against experimental *Schistosoma mansoni* infection, Exp. Parasitol. 145 (2014) 51–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.010>.
 - [25] A.C. Pereira, M.L.A. Silva, J.M. Souza, R.S. Laurentiz, V. Rodrigues, A.H. Januário, P.M. Pauletti, D.C. Tavares, A.A. Silva Filho, W.R. Cunha, J.K. Bastos, L.G. Magalhães, In vitro and in vivo anthelmintic activity of (–)-6,6-dinitrokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*, Acta Trop. 149 (2015) 195–201, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.005>.
 - [26] J.W. Espindola, M.V. Cardoso, G.B. Filho, D.A. Oliveira E Silva, D.R. Moreira, T.M. Bastos, C.A. Simone, M.B. Soares, F.S. Villela, R.S. Ferreira, M.C. Castro, V.R. Pereira, S.M. Murta, P.A. Sales Junior, A.J. Romanha, A.C. Leite, Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain, Eur. J. Med. Chem. 101 (2015) 28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.048>.
 - [27] E.F. Santiago, S.A. Oliveira, G.B. Oliveira Filho, D.R.M. Moreira, P.A.T. Gomes, A.L. Silva, A.F. Barros, A.C. Silva, T.A.R. Santos, V.R.A. Pereira, G.G.A. Gonçalves, F.A. Brayner, L.C. Alves, A.G. Wanderley, A.C.L. Leite, Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles, Antimicrob. Agents Chemother. 58 (2014) 352–363, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01900-13>.
 - [28] S.D. Gupta, G.B. Rao, M.K. Bommaka, N.M. Raghavendra, S. Aleti, Eco-sustainable synthesis and biological evaluation of 2-phenyl 1,3-benzodioxole derivatives as anticancer, DNA binding and antibacterial agents, Am. J. Chem. 9 (2016) S1875–S1883, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.004>.
 - [29] M. Patra, K. Ingram, V. Pierroz, S. Ferrari, B. Spingler, J. Keiser, G. Gasser, Ferrocenyl derivatives of the anthelmintic praziquantel: design, synthesis, and biological evaluation, J. Med. Chem. 55 (2012) 8790–8798, <http://dx.doi.org/10.1021/jm301077m>.
 - [30] J.F. Oliveira, T.S. Lima, D.B. Vendramini-Costa, S.C.B.L. Pedrosa, E.A. Lafayette, R.M.F. Silva, S.M.V. Almeida, R.O. Moura, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima, Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay, Eur. J. Med. Chem. 136 (2017) 305–314, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.023>.
 - [31] J. Pellegrino, N. Kautz, Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*, Adv. Parasitol. 6 (1968) 233–290.
 - [32] T.J. Matos-rocha, M.G. Cavalcanti, J.M. Barbosa-Filho, A.S. Lúcio, D.L. Veras, M.O. Marques, L.C. Alves, F.A. Brayner, Ultrastructural study of morphological changes in *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to the monoterpene rotundifolone, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 50 (2017) 86–91, <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0285-2016>.
 - [33] A.R. Pohlmann, J.C. Quirion, D. Guillaume, H.P. Husson, Peptídeos de conformação restrita induzida pela incorporação de unidades (aza)lactâmicas, Quím. Nova 22 (1999) 6, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000600610>.
 - [34] D.R.M. Moreira, A.D.T. Oliveira, P.A.T.M. Gomes, C.A. Simone, F.S. Villela, R.S. Ferreira, A.C. Silva, T.A.R. Santos, M.C.A.B. Castro, V.R.A. Pereira, A.C.L. Leite, Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death, Eur. J. Med. Chem. 75 (2014) 467–478, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.001>.
 - [35] M.G.R. Pitta, A.C.A. Silva, J.K.A.L. Neves, P.G. Silva, J.I. Irmão, E. Malagueño, J.V. Santana, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, M.C.P.A. Albuquerque, New imidazolidinone bisoxetones: potential candidates for antischistosomal drugs, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101 (2006) 313–316, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000900049>.
 - [36] L.M.S. Almeida, L.S.A. Carvalho, M.C. Gazolla, P.L.Z. Pinto, M.P.N. Silva, J. Moraes, A.A.S. Filho, Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms, Evid. based complement. alternat. med. (2016), <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9521349>.
 - [37] R.O. Kamel, P.E. Bayaumi, Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 112 (2017) 247–254, <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160324>.
 - [38] W. Jiraungkoorskul, S. Sahaphong, P. Sobhon, S. Riengroipitak, N. Kangwanrangsan, *Schistosoma mekongi*: the in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke, Exp. Parasitol. 113 (2006) 16–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.001>.
 - [39] M.F.M. Soliman, M.M. Ibrahim, Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study, Acta Trop. 93 (2005) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.08.006>.
 - [40] H.G. Bertão, R.A. Silva, R.J. Padilha, M.C.A. Albuquerque, G. Radis-Baptista, Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms, Parasitol. Res. 110 (2012) 2465–2473, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2786-5>.
 - [41] D.A. Yones, D.M. Badary, H.M.B. Sayed, S.A.H. Bayoumi, A.A. Khalifa, A.M. El-Moghazy, Comparative evaluation of anthelmintic activity of edible and ornamental pomegranate ethanolic extracts against *Schistosoma mansoni*, BioMed. Res. Int. (2016), <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2872708>.
 - [42] T.J. Matos-rocha, M.G.S. Cavalcanti, D.L. Veras, A.P.S. Feitosa, G.G.A. Gonçalves, N.C. portela-Junior, A.S. Lúcio, A.L. Silva, R.J.R. Padilha, M.O. Marques, J.M. Barbosa-Filho, L.C. Alves, F.A. Brayner, Ultrastructural changes in schistosom: mansoni male worms after in vitro incubation with the essential oil of mentha x villosahuds, Rev Inst Med Trop S Paulo 58 (2016) 4, <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658004>.
 - [43] T. Manneck, O. Braissant, W. Ellis, J. Keiser, *Schistosoma mansoni*: antischistosomal activity of the four optical isomers and the two racemates of mefloquine on schistosomula and adult worms in vitro and in vivo, Exp. Parasitol. 127 (2010) 260–269, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.011>.
 - [44] G. Thomas, Química Medicinal: uma Introdução, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
 - [45] S.S.F. Brandão, A.M.C. Andrade, D.T.M. Pereira, J.M.B. Filho, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, J. Barbe, A novel way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones, Heterocycl. Commun. 10 (2004) 9–14, <http://dx.doi.org/10.1515/HIC.2004.10.1.9>.
 - [46] T.J. Matos-rocha, M.D. Lima, A.L. Silva, J.F. Oliveira, A.I. Gouveia, V.B. Silva, A.S. Almeida Junior, F.A. Brayner, P.R. Cardoso, M.D. Pitta-Galdino, I.D. Pitta, M.J. Régo, L.C. Alves, M.G. Pitta, Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomocidal agentes, Rev Inst Med Trop S Paulo 59 (2017) 8, <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759008>.
 - [47] M.C. Albuquerque, T.G. Silva, M.G. Pitta, A.C. Silva, P.G. Silva, E. Malagueño, J.V. Santana, A.G. Wanderley, M.C. Lima, S.L. Galdino, J. Barbe, I.R. Pitta, Synthesis and schistosomocidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds, Pharmazie 60 (2005) 13–17.
 - [48] M.C.P.A. Albuquerque, M.G.R. Pitta, J.I. Irmão, C.A. Peixoto, E. Malagueño, J.V. Santana, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives, Lat. Am. J. Pharm. 2 (2007) 65–69.