

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA DE 3-FENILACRILOFENONA CONTRA OVOS DE *F. hepatica*.

PEDRO RASSIER DOS SANTOS¹; ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA²;
LUIZA MARQUES ARAUJO³; ROSANA BASSO KRAUS⁴; ADRIANA
FERNANDES DA SILVA⁵; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – rassier1907@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – allisonassun10@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – luizaaraujo202@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rosana_basso_kraus@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – adrisilvapiva@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – pattsn@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As chalconas são bioprecursoras dos flavonoides, sendo consideradas uma das maiores classes de produtos naturais, com ampla distribuição em plantas rasteiras ou superiores (NOWAKOWSKA, 2007). Esses compostos apresentam um sistema conjugado capaz de dar pigmento amarelo à pétalas, além de também serem encontradas em caules, raízes, folhas, frutos e sementes (ZUANAZZI, 2001). Sua estrutura básica é composta de 1,3-difenil-2-propen-1-ona, sendo, portanto, cetonas aromáticas que ocorrem naturalmente e são amplamente descritas por apresentarem propriedades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, bactericida, antimalárica, antifúngica, antiviral e leishmanicida, assim como os seus derivados sintéticos (NOWAKOWSKA, 2007; NI; MENG; SIKORSKI, 2004).

A fasciolose hepática é uma parasitose causada pelo *Fasciola hepatica*, um Trematoda que causa grandes prejuízos econômicos a pecuária mundial, visto que quando acomete os animais, acarreta na queda da produção leiteira, perda de peso, queda na fertilidade, atraso no crescimento e, em alguns casos, até mesmo em morte. Este parasita acomete vias biliares do fígado de muitas espécies animais domésticas e selvagens, sendo a fasciolose considerada uma zoonose, pois infecta o homem acidentalmente, levando a um quadro clínico normalmente grave. Vale salientar que para completar seu ciclo biológico, há a necessidade de hospedeiros intermediários, representados normalmente por moluscos pulmonata do gênero *Lymnaea* (SERRA-FREIRE, 1995).

Os parasitas helmínticos podem ser tratados com uma variedade de drogas, e o uso contínuo desses compostos contribuiu para o desenvolvimento de resistência, presente em várias espécies de parasitas contra a maioria dos anti-helmínticos disponíveis (Sangster, Cowling, & Woodgate, 2018; Dyary, 2015). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade ovicida da molécula 3-fenilacrilofenona pelo ensaio de eclosão *in vitro* de *F. hepatica*, bem como avaliar a viabilidade celular por meio do ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

2. METODOLOGIA

Procedimento de síntese:

A chalcona foi sintetizada no laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica da UFPel, por meio da reação de Claisen-Schmidt, que envolve a condensação de uma cetona aromática com um aldeído aromático na presença de um catalisador.

Caracterização química:

A identificação química dos compostos foi realizada por meio de ponto de fusão em comparação com a literatura, espectroscopia de infra-vermelho, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Obtenção de ovos de *Fasciola hepática*:

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

Ensaio de eclosão de ovos:

Foram utilizados 5.508 ovos de *F. hepatica*, distribuídos entre os controles positivo, negativo e grupo teste. Os percentuais de eclosão e atividade ovicida foram calculados segundo o descrito por Zehetmeyr *et al.* (2018). O ensaio foi realizado em triplicata em placas de fundo chato de 6 poços (KASVI, modelo K12-006), baseada na metodologia descrita por Robles-Pérez *et al.* (2014) e Arafa *et al.* (2015). Para o controle positivo adicionou-se 1000 μL de ovos, 4.970 μL de água e 30 μL de tiabendazol (0,025mg/ mL). Já o controle positivo não se adicionou o tiabendazol, sendo o volume então ajustado com água.

O composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo realizadas três diluições baseando-se no perfil de solubilidade do composto, para atingir as concentrações finais (na placa) de 180 μM , 90 μM e 45 μM .

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

Viabilidade celular (MTT Assay):

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

Análise estatística:

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O veículo de diluição (DMSO 0,5%) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle negativo (água destilada). O **gráfico 01** apresenta o percentual de ovos eclodidos e ovicida após a exposição a chalcona sintética. Para ambos percentuais, na concentração de 90 μM , o composto sintético apresenta atividade superior a atribuída ao controle positivo, enquanto que nas concentrações de 45 μM e 180 μM houve atividade equivalente ao mesmo.

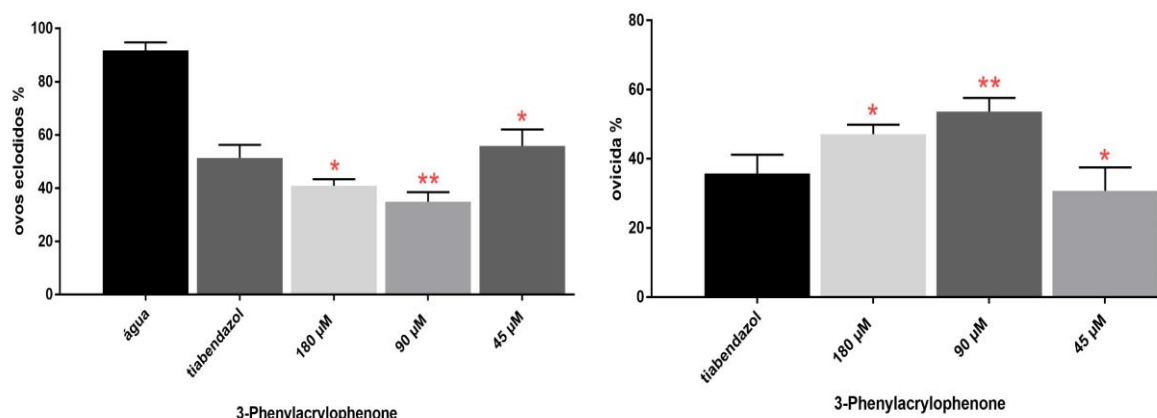


Gráfico 01. Percentual ovicida e de eclosão de ovos de *F. hepatica* em ensaio realizado com a chalcona 3-fenilacrilofenona em três concentrações (180 µM, 90 µM and 45 µM). A presença de um asterisco representa atividade equivalente estatisticamente significativa comparada com o controle positivo, enquanto que a presença de dois asteriscos representa atividade superior a apresentada pelo controle positivo ($p < 0.05$).

Para a concentração inibitória máxima (IC_{50}), o referido composto apresentou valor de 152 µM, com resultados promissores uma vez que para as três concentrações testadas o composto não apresentou citotoxicidade. Além da atividade aqui descrita, há relatos de atividade antifúngica para o referido composto, contra *Candida albicans* resistente ao fluconazol (Ritter et al., 2015). Em estudos realizados *in vitro* e *in silico*, Ferraro et al. (2016), concluem que as chalconas são bons inibidores da proteína catepsina encontrada nos estágios juvenil (FhCL3) e maduro (FhCL1) da *F. hepática*, mostram-se também alta biodisponibilidade oral e absorção intestinal (MIRANDA-SAPLA et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio do teste de eclosão de *F. hepatica* e ensaio de viabilidade celular indicam um potencial promissor para a chalcona 3-fenilacrilofenona, tendo em vista que a mesma além de apresentar atividade em todas as concentrações testadas, não apresentou citotoxicidade. Outros estudos, como por exemplo, *in vivo*, devem ser realizados para avaliar a real aplicação anti-helmíntica do composto em condições mais próximas a realidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arafa, W. M., Shokeir, K. M., & Khateib, A. M. (2015). Veterinary Parasitology Comparing an in vivo egg reduction test and in vitro egg hatching assay for different anthelmintics against Fasciola species, in cattle. Veterinary Parasitology, 214(1–2), 152–158.
- Dyary, H. O. (2015). Veterinary Anthelmintics and Anthelmintic Drug Resistance. Journal of Zankoy Sulaimani - Part A, 18(1), 191–206.

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

Miranda-sapla, M. M., Tomiotto-pellissier, F., Paulo, J., Cristina, A., Carloto, M., Taciane, B., ... Conchon-costa, I. (2019). trans- Chalcone modulates Leishmania amazonensis infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. European Journal of Pharmacology, 853, 275–288.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. Expert Opin. Ther. Patents, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. Eur. J. Med. Chem., v. 42, p. 125-137, 2007

RITTER, Marina et al. Green synthesis of chalcones and microbiological evaluation. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 26, n. 6, p. 1201-1210, 2015.

Robles-pérez, D., Martínez-pérez, J. M., & Rojo-vázquez, F. A. (2014). Veterinary Parasitology Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. Veterinary Parasitology, 203(1–2), 217–221.

Sangster, N. C., Cowling, A., & Woodgate, R. G. (2018). Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. Trends in Parasitology, 34(7), 553–563.

SERRA-FREIRE, N.M. Fasciolose hepatica. A Hora Veterinária, 1:13-18, 1995.

Zehetmeyr, F. K., Silva, M. A. M. P. da, Pereira, K. M., Berne, M. E., Aires, Cunico, W., ... Siqueira, G. M. (2018). Ovicidal in vitro activity of 2-aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones and 2-aryl-3-(3-morpholinopropyl)thiazolidin-4-ones against *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Experimental Parasitology, 192(9), 60–64.

Zuanazzi JAS. Flavonóides. In: Simões CMO. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/UFSC; 2002. p. 499-526.