

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

**VANESSA XAVIER BARBOSA**

**Obtenção por irradiação de micro-ondas, caracterização e avaliação  
esquistossomicida e antimicrobiana de novas tiossemicarbazonas derivadas  
de 1,2-naftoquinonas**

**RECIFE**

**2014**

**VANESSA XAVIER BARBOSA**

**Obtenção por irradiação de micro-ondas, caracterização e avaliação  
esquistossomicida e antimicrobiana de novas tiosemicarbazonas derivadas  
de 1,2-naftoquinonas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

**Recife**

**2014**



# FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vanessa Xavier Barbosa

Título: **Obtenção por irradiação de micro-ondas, caracterização e avaliação esquistossomícida e antimicrobiana de novas tiossemicarbazonas derivadas de 1,2-naftoquinonas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 31/10/2014

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

Instituição: Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

**Dedico esse trabalho especialmente  
ao meu avô (*in memoriam*), meu  
exemplo de sabedoria e integridade.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por caminharem sempre comigo, protegendo-me e dando-me discernimento e serenidade para escolher e trilhar os melhores caminhos.

Aos meus pais, minha fonte de força, apoio e confiança incessantes, meu recanto de amor incondicional.

Agradeço imensamente a minha irmã Viviane pelas palavras e, muitas vezes, até pela ausência delas. Obrigada por ter sido meu porto seguro, por me ouvir e entender sempre.

À minha avó, dona dos conselhos mais sábios, a minha palavra certa, na hora certa, meu obrigado mais amoroso.

Agradeço a minha Tia Antônia e ao meu Tio Marcos pela torcida e ajudas durante o caminho.

Agradeço a FACEPE pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Alexandre Góes, por ter confiado e investido em mim. Por acreditar na realização desse trabalho e pelos conhecimentos adquiridos durante mais de 5 anos de laboratório, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço Professora Mônica Camelo por ter aceitado o desafio de co-orientar este trabalho e por ensinar tudo sobre o que era necessário com muita paciência e disposição.

Agradeço à Professora Eulália pela disponibilidade, esforço e determinação na realização dos testes biológicos.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para a avaliação desta dissertação e pelas valiosas contribuições dadas para engrandecer este trabalho

Agradeço às amigas Jannieres Darc, Marlene Saraiva, Milca, Zenaide Monte por sempre estarem dispostas a me ajudar no que fosse preciso. Agradeço a Gibson, Isla e Lourenço pelos espectros das moléculas.

Agradeço às amigas Larissa Cunha e Natalia Ferraz pela grande ajuda nas traduções dos artigos e resumos e pela companhia nas madrugadas de estudo.

Agradeço aos amigos Bruno Garcia, Eduardo Bione, Flávia Regina, Geovane Marques, Henrique Pinheiro, Larissa Petrusk, Roberto França, Silvano Santos e Suely Ribeiro pela incentivo, força, e pelos ouvidos pacientes. Agradeço também pelos sorrisos, risadas e broncas, todos nas horas certas.

**“O que há de ser tem muita força.”**

**(Buda)**

# Obtenção por irradiação de micro-ondas, caracterização e avaliação esquistossomicida e antimicrobiana de novas tiossemicarbazonas derivadas de 1,2-naftoquinonas

## RESUMO

A esquistossomose é uma parasitose causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* que atinge mais de 240 milhões de pessoas no mundo, principalmente em áreas tropicais e pobres. O Praziquantel representa, na atualidade, a única alternativa de tratamento. Embora ele seja seguro e eficaz, a elevada prevalência dessa parasitose vem sendo mantida há décadas devido, principalmente, a migração da população em áreas endêmicas e ao aparecimento de resistência aos fármacos anteriormente utilizados. Diante deste contexto, o propósito deste trabalho foi sintetizar uma nova série de derivados da  $\beta$ -lapachona através da inserção de uma porção tiossemicarbazona no núcleo quinonóidico da naftoquinona. Foram sintetizados 8 compostos, sendo 7 inéditos, com diferentes tiossemicarbazonas (**3a-3h**) através de metodologias simples e com bons rendimentos, utilizando o método de aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas. A maioria dos derivados foi obtida de forma mais rápida, simples e efetiva através das reações em micro-ondas, obtendo melhores rendimentos em um tempo reacional menor quando comparada ao convencional. As estruturas moleculares foram confirmadas por massa de alta resolução, ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de infravermelho. A atividade esquistossomicida *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e dos oito derivados (**3a-3h**) foi avaliada frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Dos nove compostos testados a  $\beta$ -lapachona e o derivado **3a** (*Z*)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2*H*-benzo[*h*]cromen-6(5*H*)-ilideno)hidrazina-carbotioamida) apresentaram atividade esquistossomicida com letalidade de 100% (100  $\mu\text{M}$ ) e 83% (100  $\mu\text{M}$ ), respectivamente, durante o período de observação. No entanto, a atividade esquistossomicida do derivado **3a** foi observada já na menor concentração avaliada (12,5  $\mu\text{M}$ ), registrando 17% de vermes mortos ao final do experimento. Os demais derivados exibiram efeito na motilidade e no desacasalamento dos vermes, destacando-se os derivados **3c** e **3e**. A atividade antibacteriana da  $\beta$ -lapachona e dos derivados foi realizada frente ao *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM). A  $\beta$ -lapachona apresentou o melhor resultado com Concentração Inibitória Mínima (CIM) igual a 64  $\mu\text{g/mL}$  e os demais derivados apresentaram  $\text{CIM} \geq 128 \mu\text{g/mL}$ . Todos os compostos quando comparados à literatura exibiram CIM inferiores a antibióticos comerciais, como a ampicilina ( $\text{CIM} \geq 512 \mu\text{g/mL}$ ) e a cefoxitina ( $\text{CIM} \geq 256 \mu\text{g/mL}$ ). Dentre todos os compostos, a  $\beta$ -lapachona e o derivado **3a** foram os mais eficazes em inviabilizar vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

**Palavras-chave:** Esquistossomose. *Schistosoma mansoni*. Naftoquinonas. Tiossemicarbazidas. Síntese. Micro-ondas.

# Synthesis microwave-assisted, characterization and schistosomicidal and antimicrobial evaluation of novel thiosemicarbazones 1,2-naphthoquinones derivatives

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitosis caused by trematodes of genus *Schistosoma* that strikes more than 240 million people around the world, especially in tropical and poor regions. Praziquantel represents the only treatment alternative today. Although safe and effective, the high prevalence of this parasitosis has been maintained for decades due, mainly, to migration in endemic areas, which creates new infection outbreaks and renders resistance to once effective drugs. In this context, the purpose of this paper was to synthesize a new series of derivatives of  $\beta$ -lapachone by inserting a thiosemicarbazone portion in the naphthoquinone quinonoid center. Eight compounds were obtained, 7 being unpublished, with different thiosemicarbazones (**3a-3h**) through simple methodologies and rendering solid yields, using conventional heating and microwave irradiation processes. The majority of derivatives were more quickly, simply and effectively obtained through the microwave reactions, obtaining better yields in a less time consuming reaction when compared to the conventional. The molecular structures of all derivatives were confirmed by high-resolution mass spectrometry, nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) and infrared spectrometry. *In vitro* schistosomicidal activity of  $\beta$ -lapachone and its derivatives (**3a-3h**) was tested against adult *Schistosoma mansoni* parasites. Of all nine tested compounds  $\beta$ -lapachone and the derivative **3a** ((Z)-2-(2,2-dimethyl-5-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ylidene)hydrazine-carbothioamide) showed schistosomicidal activity, displaying a lethality of 100% (100  $\mu\text{M}$ ) and 83% (100  $\mu\text{M}$ ), respectively, during the observational period. However, the derivative **3a** displayed schistosomicidal activity at the lowest evaluated concentration (12.5  $\mu\text{M}$ ), killing 17% of worms, as observed at the end of the experiment. All other derivatives exhibited activity against parasite motility and couple dissociation, emphasizing derivatives **3c** and **3e**. Antibacterial assays were conducted to determine  $\beta$ -lapachone's and the compounds' activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).  $\beta$ -lapachone presented the best result with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 64  $\mu\text{g/mL}$  and the other derivatives showed MIC  $\geq$  128  $\mu\text{g/mL}$ . All compounds exhibited inferior MIC when compared to commercial antibiotics, such as ampicillin (MIC  $\geq$  512  $\mu\text{g/mL}$ ) and cefoxitin (MIC  $\geq$  256  $\mu\text{g/mL}$ ). Of all compounds,  $\beta$ -lapachone and the derivative **3a** were the most effective in rendering adult worms of *Schistosoma mansoni* not viable.

**Keywords:** Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Naphthoquinones, Thiosemicarbazones. Synthesis. Microwaves.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Derivados da tiossemicarbazona e da 4-tiazolidinona com atividade anti-*Toxoplasma gondii*
- Figura 2** - Relação entre o IDH e a prevalência das DTNs no Brasil
- Figura 3** - Áreas Endêmicas da Esquistossomose - Brasil (2008) – SVS/ MS
- Figura 4** - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*
- Figura 5** - Estruturas do Praziquantel, Oxamniquina e Metrifonato
- Figura 6** - Estrutura do Meclonazepam
- Figura 7** - Classificação das quinonas quanto à estrutura aromática e posição das carbonilas
- Figura 8** - Estrutura da Vitamina K
- Figura 9** - Estruturas do Lapachol (1),  $\alpha$ -lapachona (2) e  $\beta$ -lapachona (3)
- Figura 10** - Estrutura geral das tiossemicarbazonas
- Figura 11** - Estruturas da 1-formil-isoquinolina (A) e da tioacetazona (B)
- Figura 12** - Estruturas da tiazolidina (C) e da 4-tiazolidinona (D)
- Figura 13** - Diferença de temperatura entre o aquecimento convencional e o aquecimento por irradiação de micro-ondas
- Figura 14** - Série de diluições geométricas para a preparação dos compostos sintetizados
- Figura 15** - Diluição e incorporação dos derivados ao meio de cultura
- Figura 16** - Semeio dos micro-organismos em forma de estria
- Figura 17** - Estrutura das novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona (**3a-3h**)
- Figura 18** - RMN<sup>13</sup>C demonstrando os carbonos referentes à tiona e à imina
- Figura 19** - RMN<sup>13</sup>C apresentando o deslocamento dos carbonos “CH<sub>2</sub>”
- Figura 20** - RMN<sup>13</sup>C apresentando os deslocamentos das metilas dos compostos **3c** (esquerda) e **3d** (direita)
- Figura 21** - RMN<sup>1</sup>H demonstrando os sinais das metilas nos compostos **3c** (esquerda) e **3d** (direita)

## LISTA DE FIGURAS

(continuação)

- Figura 22** - RMN<sup>1</sup>H demonstrando os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos e das aminas nos compostos **3f** (esquerda) e **3g** (direita)
- Figura 23** - Placa de cultura da  $\beta$ -lapachona na concentração de 64  $\mu$ g/mL
- Figura 24** - Modificação do núcleo quinonóidico da  $\beta$ -lapachona

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Comparação entre os esqueletos do Praziquantel e da  $\beta$ -lapachona.
- Esquema 2** - Obtenção da  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona a partir do lapachol
- Esquema 3** - Síntese da beta-lapachona a partir da lausona
- Esquema 4** - Oxidação de moléculas com porção quinonóidica adaptado de Ferreira e colaboradores, 2010
- Esquema 5** - Análise retrossintética das tiossemicarbazonas
- Esquema 6** - Obtenção de derivados da tiossemicarbazona com catálise ácida
- Esquema 7** - Obtenção de derivados da tiossemicarbazona sem catálise
- Esquema 8** - Obtenção de derivados da tiossemicarbazona por método indireto
- Esquema 9** - Condensação *one-pot* de três componentes para síntese de derivados da 4 – tiazolidinona
- Esquema 10** - Obtenção *one-pot* de 4-tiazolidinonas com DCC pelos métodos convencional e por irradiação de micro-ondas
- Esquema 11** - Obtenção de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas substituídas
- Esquema 12** - Obtenção de 4-tiazolidinonas a partir de derivados da tiouréia
- Esquema 13** - Descarboxilação do ácido 2 – indol-carboxílico
- Esquema 14** - Condensação de aldeídos aromáticos com compostos de metileno ativos na presença de sulfamato de amônio
- Esquema 15** - Acoplamento da 2-bromopiridina com a pirrolidina
- Esquema 16** - Obtenção de 2-hidrazolil-4-tiazolidinona
- Esquema 17** - Reação ácido-base envolvida no processo de extração do lapachol
- Esquema 18** - Obtenção da  $\beta$ -lapachona a partir do lapachol
- Esquema 19** - Mecanismo reacional para a obtenção da  $\beta$ -lapachona a partir do lapachol
- Esquema 20** - Rota sintética empregada para a síntese dos derivados **3a-3h**
- Esquema 21** - Mecanismo reacional de síntese dos derivados **3a-3h**
- Esquema 22** - Eletrofilicidade dos carbonos das carbonilas C-5 e C-6 em relação à ressonância da  $\beta$ -lapachona
- Esquema 23** - Estudos de síntese do derivado **3a**

## **LISTA DE ESQUEMAS**

**(continuação)**

**Esquema 24 -** Estudos de síntese do derivado **3b**

**Esquema 25 -** Rota de fragmentação dos derivados **3a-3h**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Subdivisão dos parasitas causadores das Doenças tropicais Negligenciadas (DTNs)
- Tabela 2** - Tipos de Esquistossomose, Espécies, Vetores e Distribuição geográfica.
- Tabela 3** - Micro-organismos multirresistentes avaliados
- Tabela 4** - Rendimentos e tempos reacionais dos derivados **3a-3h** empregando as metodologias de irradiação por micro-ondas e convencional
- Tabela 5** - Bandas de absorção referentes à manutenção do esqueleto da  $\beta$ -lapachona
- Tabela 6** - Bandas de absorção referentes à inserção da porção tiossemicarbazona
- Tabela 7** - Relação da fórmula molecular e do pico m/z
- Tabela 8** - Avaliação Esquistossomicida *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e dos derivados **3a-3h**

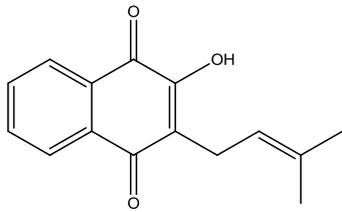
## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>4-ETSC</b>	4- etil-tiossemicarbazida
<b>4-FTSC</b>	4-fenil-tiossemicarbazida
<b>4-MTSC</b>	4-metil-tiossemicrbazida
<b>4-TZD</b>	4-tiazolidinona
<b>AcOH</b>	Ácido Acético Glacial
<b>AcOONa</b>	Acetato de Sódio
<b>APTS</b>	Ácido <i>p</i> -tolueno-sulfônico
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio Deuterado
<b>DDVP</b>	2,2-diclorovinil-dimetil-fosfato
<b>DPD<sub>x</sub> – CDC</b>	Laboratório de identificação de doenças parasitárias de interesse a Saúde Pública – Centro de Controle de Prevenção de Doenças
<b>DTN</b>	Doença Tropical Negligenciada
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>EtOH</b>	Etanol Absoluto
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HDZ</b>	Hidrazina
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano
<b>ITCF</b>	Isotiocianato de Fenila
<b>IVTF</b>	Infravermelho Transformada de Fourier
<b>MO</b>	Micro-ondas
<b>MTF</b>	Metrifonato
<b>NADPH</b>	Fosfato de Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OXM</b>	Oxamniquina
<b>P.f.</b>	Ponto de fusão
<b>PNUD</b>	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
<b>PZQ</b>	Praziquantel

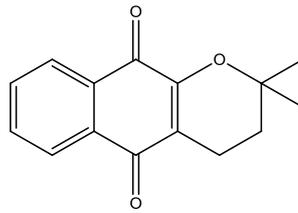
**LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**  
**(continuao)**

<b>RMN<sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN<sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio
<b>SES/SP – CVE</b>	Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo – Centro de Vigilância Epidemiológica
<b>TSC</b>	Tiossemicarbazona
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-visível

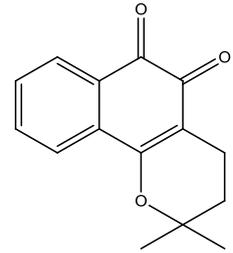
## LISTA DE COMPOSTOS



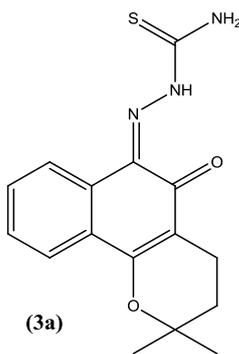
(1) Lapachol



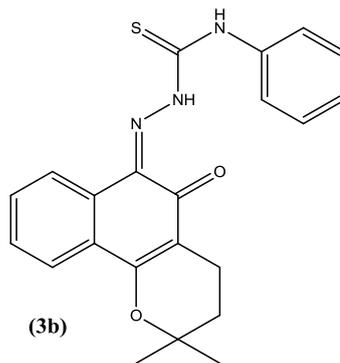
(2)  $\alpha$ -lapachona



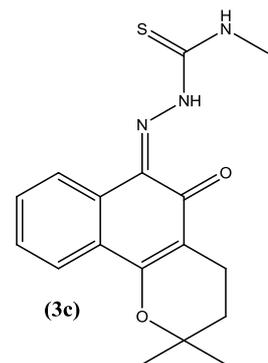
(3)  $\beta$ -lapachona



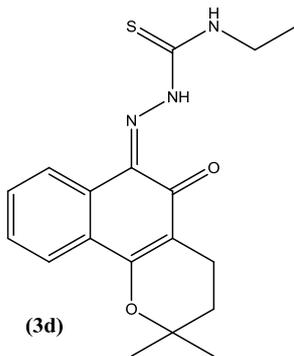
(3a)



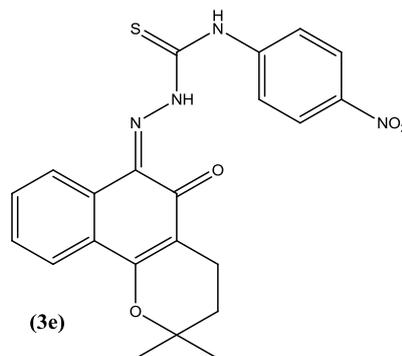
(3b)



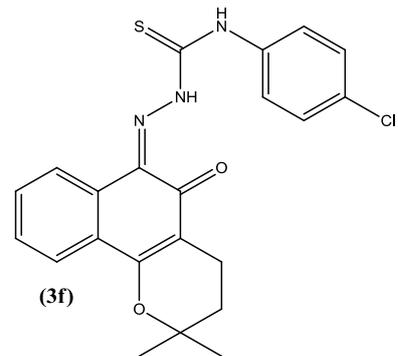
(3c)



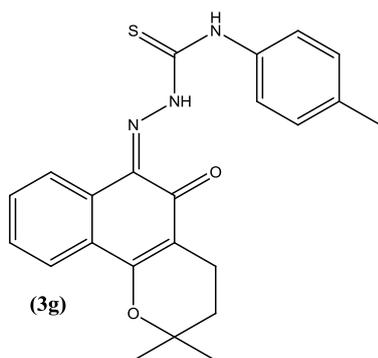
(3d)



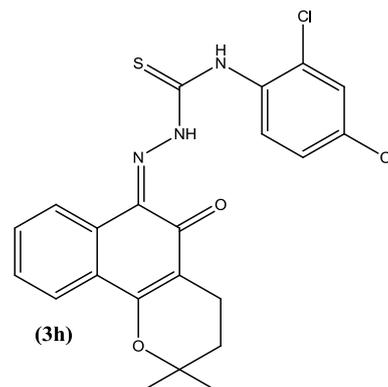
(3e)



(3f)



(3g)



(3h)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	23
2	OBJETIVOS.....	27
	2.1 Objetivo Geral.....	28
	2.1 Objetivos Específicos.....	28
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	29
	3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	30
	3.2 Esquistossomose .....	32
	3.2.1 Epidemiologia.....	32
	3.2.2 Biologia e Ecossistema.....	34
	3.2.3 Ciclo Biológico.....	35
	3.2.4 Ecossistema e Transmissão .....	37
	3.2.5 Controle .....	37
	3.2.6 Tratamento.....	37
	3.3 Quinonas .....	40
	3.2.7 Naftoquinonas.....	42
	3.3 $\beta$ -lapachona.....	44
	3.4 Tiossemicarbazonas .....	47
	3.4.1 Síntese de tiossemicarbazonas.....	48
	3.5 Tiazolidinonas.....	51
	3.5.1 Métodos de síntese de 4-tiazolidinonas.....	52
	3.6 Química de micro-ondas .....	54
	3.6.1 Aquecimento por micro-ondas .....	55
	3.6.2 Reações em micro-ondas .....	57
	3.6.3 Benefícios da utilização do reator de micro-ondas em síntese orgânica .....	58

4	METODOLOGIA .....	60
4.1	Materiais .....	61
4.2	Metodologias de Síntese .....	62
4.2.1	Procedimento para a extração do Lapachol .....	62
4.2.2	Procedimento para a obtenção da $\beta$ -lapachona a partir do Lapachol .....	62
4.2.3	Procedimento geral para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona por irradiação por micro-ondas .....	64
4.2.3.1	<b>Utilizando tiossemicarbazidas</b> .....	64
4.2.4	Procedimento geral para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona por aquecimento convencional.....	65
4.2.4.1	<b>Utilizando tiossemicarbazidas</b> .....	65
4.2.4.2	<b>Utilizando hidrato de hidrazina e isotiocianato</b> .....	65
4.2.5	Dados dos compostos sintetizados .....	65
4.3	Avaliações Biológicas.....	78
4.3.1	Avaliação esquistosomicida <i>in vitro</i> .....	78
4.3.1	Avaliação antibacteriana <i>in vitro</i> .....	80
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	84
5.1.	SÍNTESE.....	85
5.1.1.	Lapachol .....	85
5.1.2.	$\beta$ -lapachona.....	85
5.1.3.	Síntese das Tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona (3a-3h) .....	87
5.1.3.2.	Estudos de síntese do derivado 3a – (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida .....	90
5.1.3.3	Estudos de síntese do derivado 3b - (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida.....	91
5.1.3.3.	Derivados 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h .....	92
5.1.4.	Caracterização espectrométrica da $\beta$ -lapachona e seus derivados 3a-3h .....	94

5.1.5	Tentativas de síntese do produto BV-NO <sub>2</sub> .....	102
5.1.6	Tentativas para a obtenção do ciclo 4-tiazolidinona .....	103
5.2	Avaliação Biológica.....	104
5.2.1	Avaliação esquistossomicida.....	105
5.2.2	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA .....	110
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	113
	REFERÊNCIAS .....	116
	ANEXOS .....	125
	Anexo 1 – Espectros da β-lapachona.....	126
	Infravermelho .....	126
	Massa de alta resolução.....	127
	RMN <sup>1</sup> H.....	128
	RMN <sup>13</sup> C .....	131
	Anexo 2 – Espectros derivado 3a: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida .....	133
	Infravermelho .....	133
	Massa de alta resolução.....	134
	RMN <sup>1</sup> H.....	136
	RMN <sup>13</sup> C .....	137
	Anexo 3 – Espectros derivado 3b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida .....	139
	Infravermelho .....	139
	Massa de Alta Resolução .....	140
	RMN <sup>1</sup> H.....	142
	RMN <sup>13</sup> C .....	143
	Anexo 4 – Espectros derivado 3c: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)-N-metil-hidrazina-carbotioamida .....	145

Infravermelho .....	145
Massa de alta resolução.....	146
RMN <sup>1</sup> H.....	148
RMN <sup>13</sup> C .....	149
Anexo 5 – Espectros do derivado 3d: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-etil-hidrazina-carbotioamida.....	151
6.1.1. Infravermelho .....	151
Massa de alta resolução.....	152
RMN <sup>1</sup> H.....	154
RMN <sup>13</sup> C .....	155
Anexo 6 – Espectros do derivado 3e: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazina-carbotioamida .....	157
Infravermelho .....	157
Massa de alta resolução.....	158
RMN <sup>1</sup> H.....	160
RMN <sup>13</sup> C .....	161
Anexo 7 – Espectros do derivado 3f : (Z)-N-(4-clorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida .....	163
Infravermelho .....	163
Massa de alta resolução.....	164
RMN <sup>1</sup> H.....	166
RMN <sup>13</sup> C .....	167
Anexo 8 – Espectros do derivado 3g: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(p-toluil)hidrazina-carbotioamida.....	169
Infravermelho .....	169
Massa de alta resolução.....	170
RMN <sup>1</sup> H.....	172

RMN <sup>13</sup> C .....	173
Anexo 9 – Espectros do derivado 3h: (Z)-N-(2,4-diclorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida .....	175
Infravermelho .....	175
RMN <sup>1</sup> H.....	178
RMN <sup>13</sup> C .....	179
Anexo 10 - Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	181
APÊNDICES .....	182
Apêndice 1 - Artigo Publicado na Revista Experimental Parasitology .....	183
Apêndice 2 - Artigo Publicado na Revista Phytomedicine.....	191

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1 INTRODUÇÃO**

A esquistossomose é uma doença crônica parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma* e tem como vetor intermediário o molusco do gênero *Biomphalaria* (WHO, 2010, 2013). No mundo, estima-se que há mais de 249 milhões de pessoas infectadas e que 700 milhões habitem locais de risco eminente de infecção. Ela está disseminada por mais 76 países, com 90% dos casos concentrados na África Subsaariana (WHO, 2014). No Brasil, o número de infectados pode chegar a 6 milhões de pessoas que vivem, primordialmente, em áreas endêmicas que compreendem seis estados do Nordeste, exceto Maranhão, Piauí e Ceará, e dois do Sudeste, Minas Gerais e Espírito Santo (REY, 2002; SVS/MS, 2009). Classificada pela OMS como Doença Tropical Negligenciada (DTN), a esquistossomose é a segunda infecção parasitária mais disseminada no mundo, perdendo apenas para a malária.

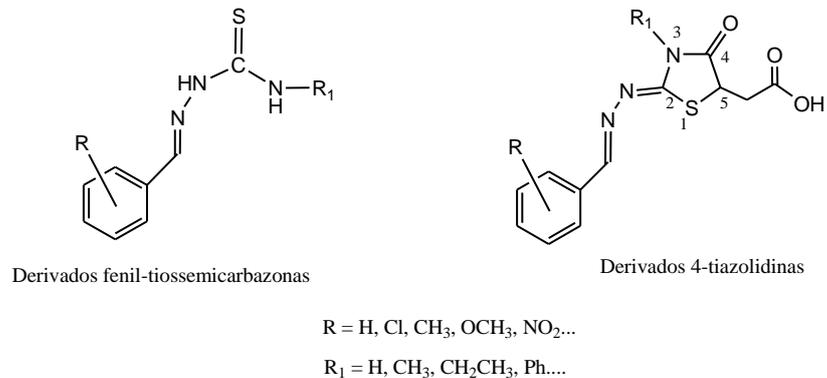
O tratamento para esta parasitose é bastante precário, tendo o Praziquantel (PZQ) como o único fármaco de escolha indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014). Por isso, ele é vastamente utilizado a mais de 20 anos. Embora o PZQ seja eficaz no tratamento na esquistossomose, fatores como a migração população em áreas endêmicas e reinfeção de indivíduos já tratados, tornam o tratamento desta parasitose cada vez mais difícil (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; MELMAN et al., 2009; WU; WANG; HUANG, 2011).

Neste panorama preocupante, o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas tornou-se ponto crítico no processo de tratamento e controle da doença (PICA-MATTOCCIA et al., 2009; SADHU et al., 2012). Porém, apesar da busca de novas entidades terapêuticas serem uma atividade contínua tanto no meio acadêmico quanto nas indústrias farmacêuticas, não houve novas descobertas para o tratamento da esquistossomose nos últimos 20 anos.

Essa necessidade global tem incentivado pesquisas nesta área, e promovido, na comunidade científica, discussões sobre estratégias viáveis para a descoberta de novas substâncias terapêuticas. Uma análise realizada nesse âmbito evidenciou que uma das principais formas de descoberta de novos fármacos é a modificação estrutural de substâncias bioativas já existentes com estruturas bem definidas. Elas são conhecidas como protótipos e tem sido a estratégia mais interessante economicamente para a indústria farmacêutica. A

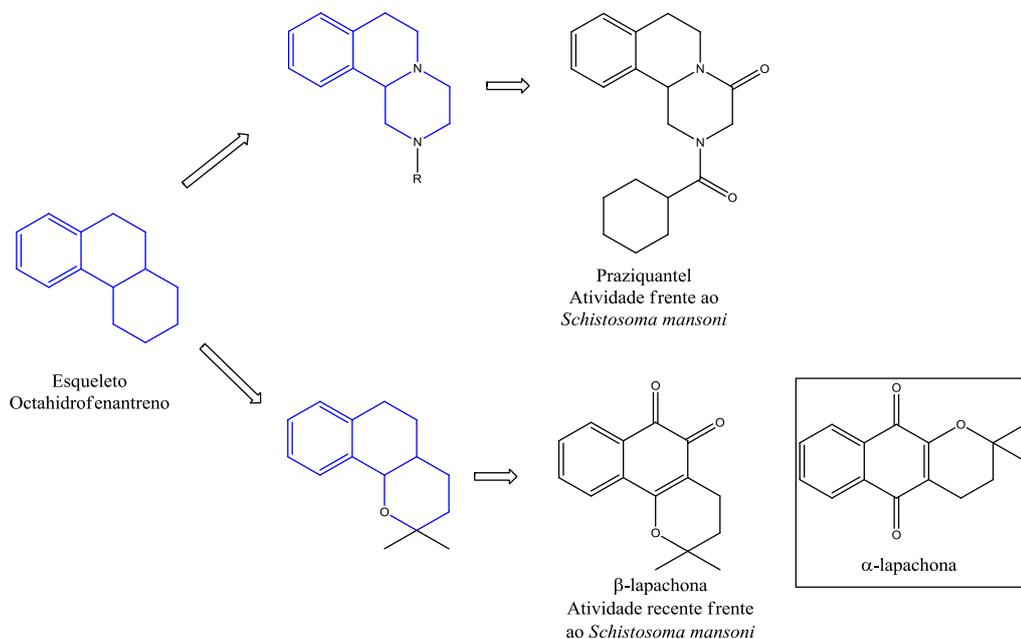
obtenção de novos fármacos de análogos estruturais com otimização na farmacocinética e/ou na farmacodinâmica é o objetivo principal desta estratégia.

Neste contexto, trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa demonstraram que tanto as tiossemicarbazonas como as 4-tiazolidinonas, contendo uma função ácido acético na posição 5 e substituídas na porção aril-hidrazona, possuem consideráveis atividades antiparasitárias *in vitro* contra o *Toxoplasma gondii* (Figura 1) (GÓES; TENÓRIO, 2005a).



**Figura 1 – Derivados da tiossemicarbazona e da 4-tiazolidinona com atividade anti-*Toxoplasma gondii*.**

Analisando estruturalmente o Praziquantel, percebemos a similaridade do formato do seu esqueleto com o da  $\beta$ -lapachona, orto-naftoquinona derivada do lapachol (Esquema 1).



**Esquema 1- Comparação entre os esqueletos do Praziquantel e da  $\beta$ -lapachona.**

Testamos, então, a atividade da  $\beta$ -lapachona frente ao *Schistosoma mansoni*, e foram obtidos resultados expressivos *in vitro* (morte de 100% dos parasitas em 24 horas na dose de 100  $\mu$ M) e moderados *in vivo* (redução da carga parasitária em 40%) (AIRES et al., 2014a, 2014b). Porém, o mesmo teste com o seu isômero  $\alpha$ -lapachona não apresentou resultados interessantes. Isto mostra que estes arranjos estruturais possuem diferenças significativas quanto às propriedades químicas, físicas e biológicas das moléculas.

Com base nos resultados encorajadores obtidos com a  $\beta$ -lapachona frente ao *Schistosoma mansoni*, e considerando as atividades antiparasitárias das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, será que ao inserir estas duas porções na  $\beta$ -lapachona, não haveria um incremento na atividade esquistossomicida *in vitro* frente ao parasita em questão?

Embasando-se em nossos trabalhos anteriores e no âmbito de uma linha de pesquisa que visa à obtenção de novas substâncias de interesse terapêutico em doenças negligenciadas, foram sintetizados novos análogos estruturais das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas contendo no lugar do grupo fenil-substituído a porção  $\beta$ -lapachona através de metodologias curtas e simples.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Sintetizar novos derivados da  $\beta$ -lapachona contendo uma porção tiossemicarbazona e 4-tiazolidinona, e avaliação da atividade esquistossomicida e antimicrobiana *in vitro*.

## **2.1 Objetivos Específicos**

- Obter novos derivados das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas através de reações convencionais e por irradiação de micro-ondas;
- Determinar as estruturas de todas as moléculas em estudo através dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IV e MS;
- Avaliar o potencial das novas moléculas obtidas frente ao *Schistosoma mansoni*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### 3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as DTNs constituem um grupo de 17 infecções parasitárias crônicas, das quais nove são causadas por microparasitas patógenos e oito por macroparasitas patógenos, os quais envolvem vetores, e intermediários (Tabela 1) (WHO, 2014). Juntas, elas representam as doenças mais comuns da população pobre do mundo (WHO, 2010).

**Tabela 1 – Subdivisão dos parasitas causadores das Doenças tropicais Negligenciadas (DTNs) (WHO, 2014)**

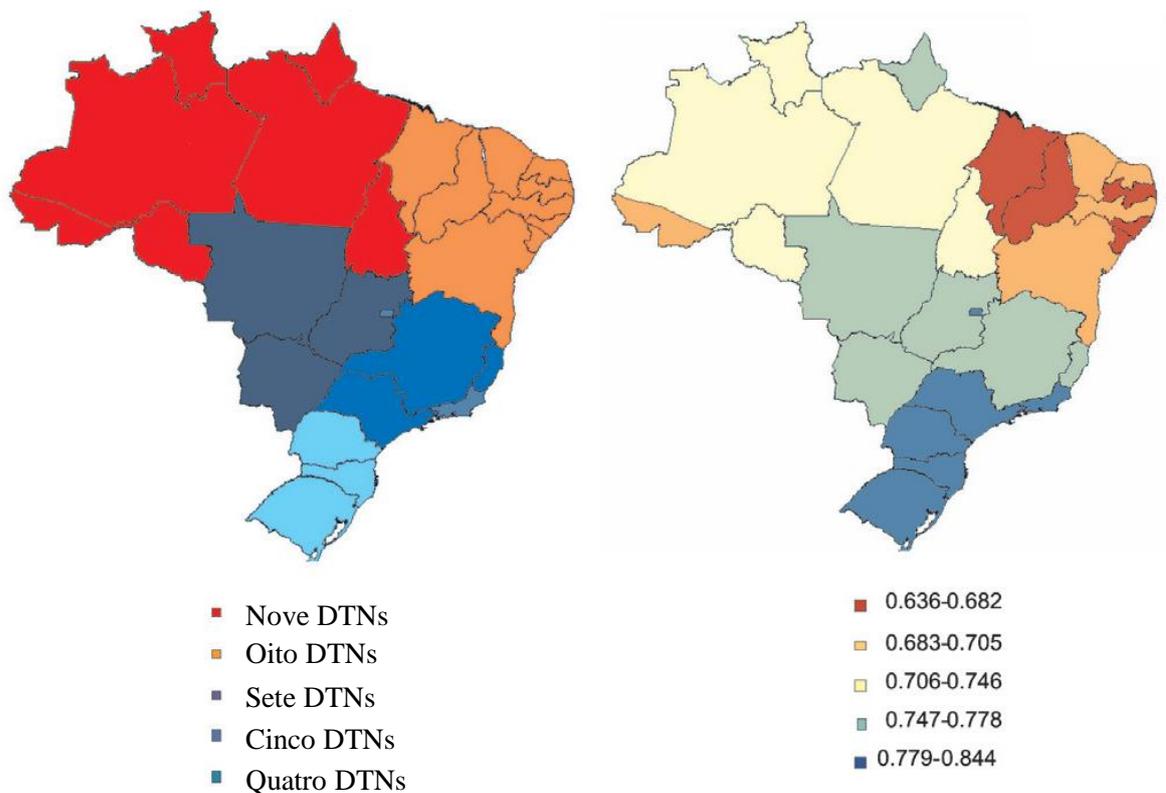
<b>Parasitas causadores das Doenças tropicais Negligenciadas (DTNs)</b>	
<b>Microparasitas patógenos</b>	<b>Macroparasitas patógenos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Úlcera de Buruli</b></li> <li>• <b>Doença de Chagas</b></li> <li>• <b>Dengue</b></li> <li>• <b>Tripanossomíase Humana Africana (Doença do sono)</b></li> <li>• <b>Leishmaniose</b></li> <li>• <b>Hanseníase</b></li> <li>• <b>Tracoma</b></li> <li>• <b>Treponematoses</b></li> <li>• <b>Raiva</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisticercose</li> <li>• Dracunculíase</li> <li>• Equinococose</li> <li>• Filariose</li> <li>• Oncocercose</li> <li>• Esquistossomose</li> <li>• Helmintíases transmitidas pelo solo</li> <li>• Trematodíases transmitidas por alimentos</li> </ul>

Embora sejam clinicamente diversas e possuam diversos agentes etiológicos, como parasitas (helmintos e protozoários), bactérias, ectoparasitas ou fungos (LINDOSO; LINDOSO, 2009a), essas patologias constituem um mesmo grupo porque todas estão fortemente associadas com condições de vida e moradia precárias. Além disso, se desenvolvem em ambientes pobres e prosperam melhor em áreas tropicais onde, normalmente, elas coexistem nos indivíduos e não recebem a devida atenção dos governos e de iniciativas de estudos científicos (LINDOSO; LINDOSO, 2009a; WHO, 2014).

Essas patologias são endêmicas em pelo menos 149 países, dos quais em 100 são endêmicos para uma ou mais doenças, e em 30 países para 6 ou mais. As DTNs disseminam-

se por todo globo, atingindo mais de um bilhão de pessoas de diferentes culturas, religiões, política e economia que comungam, apenas, a precária condição de vida. Responsáveis por enormes níveis de morbidade e mortalidade, atraso no desenvolvimento físico e cognitivo de crianças, perda de produtividade no trabalho entre outros, essas infecções contribuem de forma incisiva para a produção e manutenção da pobreza (HOTEZ; SAVIOLI; FENWICK, 2012; HOTEZ, 2008; LAMMIE et al., 2007).

As DTNs se distribuem prevalentemente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, principalmente, em países que apresentam baixos Índices de Desenvolvimento Humano (IDH). O Brasil possui o 85º IDH numa listagem de 187 países, figurando na faixa de IDH elevado estabelecido pelo Relatório de Desenvolvimento Humano de 2013, publicado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) (PNUD, 2013). Mesmo classificado na faixa de IDH elevado, segundo Lindoso e colaboradores (2009), o Brasil apresenta nove das doenças tropicais negligenciadas estabelecidas pela ONU. Similar ao que ocorre em nível mundial, no Brasil também há uma relação direta entre a prevalência das DTNs e o IDH, ou seja, as áreas mais pobres, principalmente das regiões Norte e Nordeste do país, são as de maiores prevalências dessas infecções (Figura 2).



**Figura 2 - Relação entre o IDH e a prevalência das DTNs no Brasil (LINDOSO; LINDOSO, 2009a)**

Considerando todas as DTNs, há milhares de pessoas que sofrem com essas patologias e milhões que ainda estão correndo risco de infecção, isso só no Brasil. Em escala mundial, essas doenças atingem 77 países, elevando para escala de bilhões o número de pessoas infectadas. Dentre as DTNs, a esquistossomose é a segunda mais disseminada pelo mundo, sendo superada apenas pela malária (WHO, 2010). Mas, mesmo com esses valores preocupantes, o investimento no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas e os programas de controles existentes ainda não são suficientes para o controle e dizimação eficiente da esquistossomose (HOTEZ et al., 2008).

### **3.2 Esquistossomose**

A esquistossomose é uma doença crônica causada por parasitas do gênero *Schistosoma*. Apresenta dois tipos de hospedeiros, um definitivo (homem) e um intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*). O primeiro é habitado pelas formas adultas que se localizam nos vasos mesentéricos (mansônica) ou no trato urinário (urogenital), e não há o desenvolvimento das formas intermediárias. Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez, em 1851, pelo patologista Theodor Bilharz, sendo por isso denominada, na época, como bilharzíase (RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOVSKI-ALMEIDA; LEITE, 2006).

#### **3.2.1 Epidemiologia**

A esquistossomose é prevalentemente encontrada em países pobres e/ou em desenvolvimento, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Estima-se que mais de 240 milhões de pessoas estejam infectadas e necessitem de tratamento. Porém, apesar do número de pessoas tratadas ter aumentado de 12,4 milhões em 2006 para 33,5 milhões em 2010, esse índice ainda se encontra muito distante do valor total, tendo-se como agravante o fato de cerca de 700 milhões de pessoas estarem em locais de risco de infecção (WHO, 2013).

A transmissão da esquistossomose tem sido documentada em 76 países, dos quais 54 apresentam maior risco de infecção (ENGELS et al., 2002; WHO, 2013). A África subsaariana suplanta 90% dos casos. Essa supremacia pode ser explicada pelos vários ressurgimentos da doença no continente africano, que atualmente é em resposta as mudanças hidrológicas na tentativa de suprir a população que tem aumentado, e assim acaba por propiciar o desenvolvimento do caramujo, vetor intermediário (BRINDLEY et al., 2009).

Em relação às Américas, pouca atenção tem sido focada pela impressão equivocada de que as DNTs, dentre elas a esquistossomose, já não representam uma problema de saúde pública na região. A carga dessa doença nas Américas tem sido tema de preocupação de alguns autores, porque apesar da diminuição da prevalência, essa infecção parasitária ainda representa uma ameaça (LAMMIE et al., 2007).

No Brasil, a esquistossomose é endêmica e o número de casos tem sido estimado entre cinco e seis milhões de pessoas infectadas, sendo uma das doenças infecciosas mais relevantes, devido a sua alta morbidade, mortalidade e ampla distribuição geográfica. As taxas de prevalência variam de acordo com o estado e o tempo decorrido (NEVES, 2005; REY, 2002)(Figura 3). As áreas endêmicas estão localizadas principalmente na região nordeste, compreendendo as Zonas do Litoral e da Mata, do Agreste e do Brejo dos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, quase todo território de Alagoas e Sergipe, e grande parte da Bahia. Na região sudeste, aparece em metade do território de Minas Gerais e na Zona Serrana do Espírito Santo (Figura 3).



**Figura 3 – Áreas Endêmicas da Esquistossomose - Brasil (2008) – SVS/ MS (SVS/MS, 2009).**

Em relação à prevalência, as maiores taxas são encontradas em Pernambuco e Alagoas, seguido de Bahia e Paraíba. Pontos de infecção já foram encontrados em outros estados como o Maranhão, Pará, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (REY, 2002).

Devido à migração de populações de zonas endêmicas, indivíduos infectados com esquistossomose podem ser identificados em todos os estados brasileiros, independente da presença de focos de transmissão. Isto facilita o desenvolvimento de novos focos de infecção em algumas áreas, colaborando com a expansão da doença (REY, 2002; SVS/MS, 2009).

### **3.2.2 Biologia e Ecossistema**

Os helmintos e os platelmintos, juntos, correspondem aos agentes infecciosos mais comuns nos humanos em países em desenvolvimento (BRINDLEY et al., 2009). A esquistossomose é uma doença produzida por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* (Tabela 2). Pertencentes à classe Digenea, são inteiramente adaptados ao parasitismo, e suas espécies atacam a população humana nas regiões tropicais e temperadas do mundo, principalmente nas áreas menos desenvolvidas. O *Schistosoma* se distingue dos outros vermes da classe Digenea por apresentar os sexos separados, acentuado dimorfismo sexual e pelos machos terem menos de 10 massas testiculares (NEVES, 2005; REY, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem 6 espécies infecciosas que podem manifestar duas formas principais da Esquistossomose, entretanto só 3 espécies podem acometer os humanos, o *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni* (Tabela 2) (WHO, 2010). A primeira espécie é responsável pelo desenvolvimento da esquistossomose do tipo urinária, principalmente na África Subsaariana. As duas últimas espécies são vetores da esquistossomose intestinal, estando o *S. japonicum* distribuído pelo continente asiático e o *Schistosoma mansoni* nas Américas, África e Arábia (WHO, 2013).

**Tabela 2 – Tipos de Esquistossomose, Espécies, Vetores e Distribuição geográfica. Fonte WHO, 2010.**

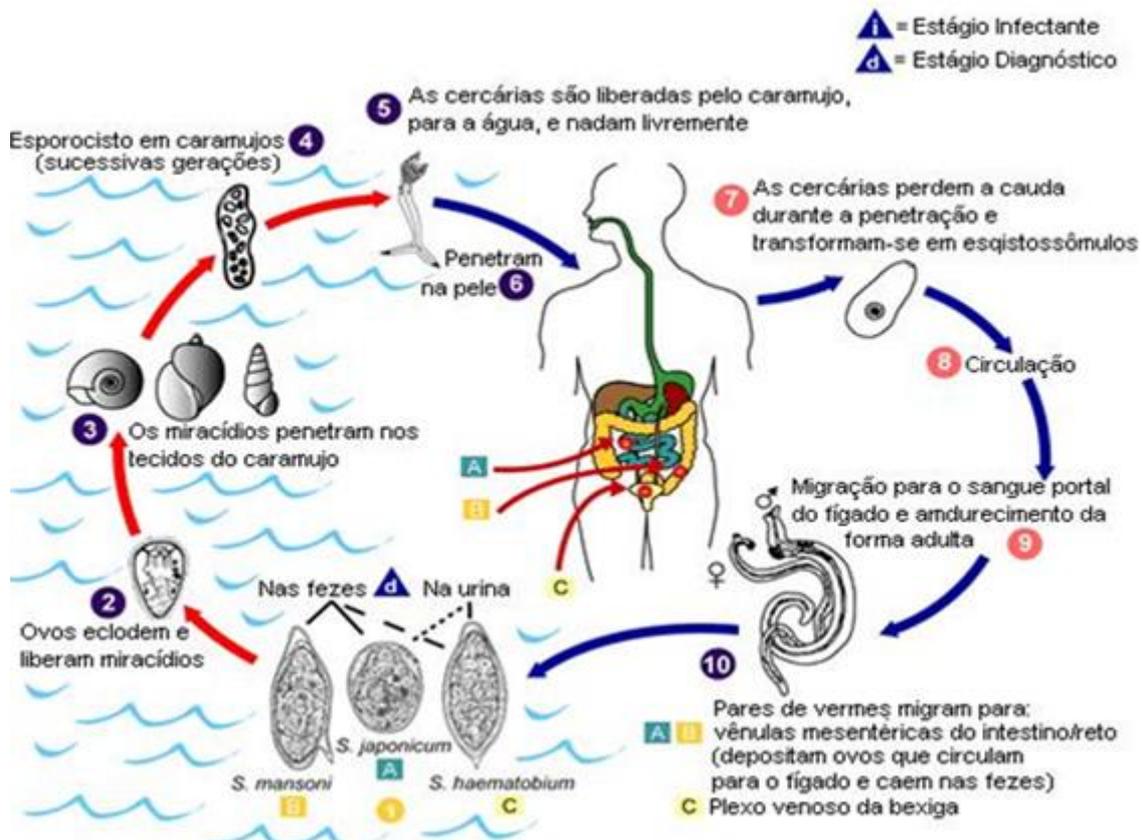
<b>Tipo</b> Esquistossomose	<b>Espécies</b>	<b>Vetores</b> (Gênero)	<b>Distribuição Geográfica</b>
<b>Urogenital</b>	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Bulinus spp.</i>	Principalmente África e Oriente Médio
	<i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus spp.</i>	Região da Floresta tropical da África
<b>Intestinal</b>	<i>S. mekongi</i>	<i>Neotricula spp.</i>	Camboja, República Democrática Popular do Lao
	<i>S. mansoni*</i>	<i>Biomphalaria spp</i>	Américas, África e Arábia
	<i>S. japonicum*</i>	<i>Oncomelania</i>	China, Indonésia e Filipinas

### 3.2.3 Ciclo Biológico

A transmissão e o ciclo de vida do *Schistosoma* podem ser divididos em algumas etapas para o melhor entendimento (NEVES, 2005; REY, 2002) (Figura 4):

- 1) **Liberação dos ovos pelas fezes ou urina:** pessoas infectadas expelem os ovos do parasita através das fezes e urina. Em locais sem saneamento básico e com condições de vida precárias, esses ovos podem entrar em contato com as águas de irrigação de alimentos, rios e reservatórios.
- 2) **Eclosão dos ovos:** em contato com a água, os ovos eclodem liberando as larvas chamadas de miracídios
- 3) **Infecção dos Caramujos:** os miracídios nadam algum tempo até encontrarem os seus vetores, no caso do *Schistosoma mansoni*, o molusco do gênero *Biomphalaria*.

- 4) **Esporocistos:** dentro do molusco, o miracídio transforma-se em uma nova larva, o esporocisto. Ele produz, gradativamente, milhares de novos parasitas, as cercárias.
- 5) **Liberação das cercárias:** os caramujos liberam as cercárias que livres, ficam nadando na água, quase sempre em direção à superfície, até que tenham a oportunidade de penetrar na pele do hospedeiro definitivo (homem).
- 6) **Penetração na pele:** o homem (hospedeiro definitivo) é infectado quando a pele entra em contato com a cercária na água.



**Figura 4 – Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*. (Fonte: SES/SP – CVE adaptado de DPDx- CDC) (BRASIL, 2004; CDC/ATLANTA/USA. DPDx, 2013).**

- 7) **Esquistossômulo:** Cada cercária que consegue sobreviver no processo de penetração da pele, perde a cauda e logo se transforma em esquistossômulo, última forma larvária desse parasito.
- 8) **Migração:** os esquistossômulos que não foram destruídos na pele atingem a circulação geral e vão ao coração, depois pulmões, e então seguem para o fígado.
- 9) **Desenvolvimento:** somente os esquistossômulos que chegarem ao sistema porta intra-hepático podem completar o ciclo biológico e chegar à fase adulta.

**10) Fase adulta:** os vermes adultos acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, onde depositam os ovos que são liberados para o meio externo.

### 3.2.4 Ecossistema e Transmissão

Para que a Esquistossomose se torne endêmica ou exista numa região, é necessário que haja condições e características particulares que podem ser descritas em 4 tópicos (NEVES, 2005; REY, 2002; WHO, 2010, 2013, 2014):

- 1) **Fonte de Infecção:** representada pelas pessoas infectadas pela esquistossomose, os ditos hospedeiros definitivos.
- 2) **Vetores:** existência, na região em questão, de pelo menos uma espécie de molusco do gênero *Biomphalaria* (*S. mansoni*).
- 3) **Água doce:** fontes adequadas para a vida dos hospedeiros intermediários e às fases de vida livre dos parasitos.
- 4) **Hábitos da população:** está relacionado normalmente com as condições socioeconômicas da população, que induzem os habitantes ao contato com fontes de água doce, facilitando a contaminação dessa água, transformando-a em fonte de infecção.

### 3.2.5 Controle

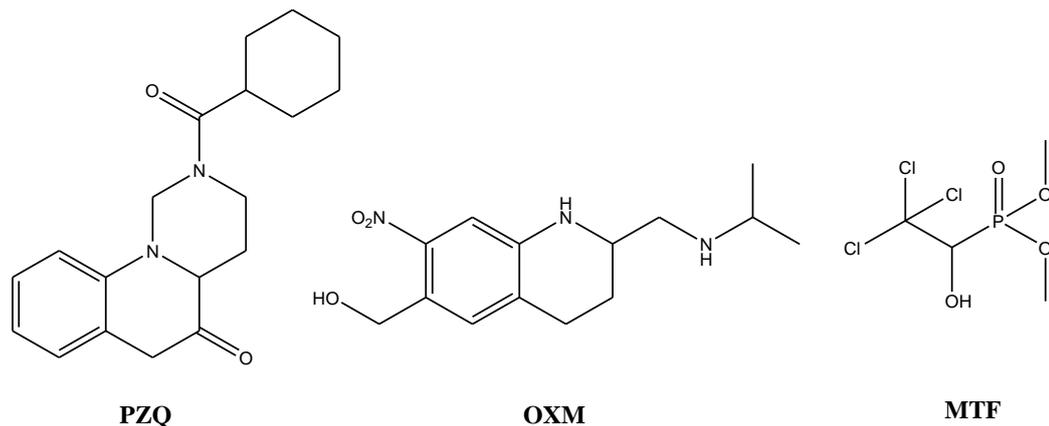
As estratégias de controle da doença englobam o saneamento adequado, provisão de água segura, controle do caramujo e campanhas em massa de tratamento medicamentoso com o praziquantel. As limitações dessas estratégias consistem na dificuldade do controle dos vetores intermediários, e na disponibilidade do praziquantel, que é o fármaco de referência no tratamento da Esquistossomose (WHO, 2010).

### 3.2.6 Tratamento

O arsenal de fármacos para o tratamento da esquistossomose é bastante reduzido. O Praziquantel é o mais utilizado na clínica médica por ter a maior eficácia e taxa de sucesso no tratamento, ser barato, facilmente disponível, além de ser o mais bem tolerado pelos indivíduos, o que o torna a melhor opção para os tratamentos em massa. Somando-se ao PZQ, havia dois medicamentos de escolha: o metrifonato (MTF) e a oxamniquina (OXM) (MELMAN et al., 2009)(Figura 5).

O MTF é um pró-fármaco organofosforado de baixo peso molecular, que em pH fisiológico é convertido de forma não enzimática a DDVP (2,2-diclorovinil-dimetil-fosfato), um potente inibidor da colinesterase (TRACY, JW ; WEBSTER, 2011). O metrifonato era utilizado como alternativa ao PZQ em casos de esquistossomose urinária pelo *Schistosoma haematobium*, e/ou em conjunto com a oxamniquina quando havia infecção por *S. mansoni* e *S. haematobium*, concomitantemente (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003).

A OXM é um derivado tetraidroquinolínico com atividade restrita sobre a esquistossomose mansônica, atuando em todos os estágios evolutivos. O seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas aparentemente o fármaco se liga ao material genético do helminto. Com a utilização da oxamniquina, os parasitas não cessam a oviposição.



**Figura 5 – Estruturas do Praziquantel, Oxamniquina e Metrifonato.**

O *S. mansoni* adulto levado pela circulação porta-hepática, é envolvido pelo sistema inflamatório e fagocitado. Os relatos na literatura de resistência a oxamniquina estão relacionados a um gene autossômico recessivo do verme que controla a expressão de uma enzima necessária para a ativação da OXM. Parasitos que possuem essa enzima mostram-se sensíveis a OXM, enquanto os outros apresentam perfil de resistência (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; MORONI, 1992). Apesar de ser ativa e apresentar baixa incidência de efeitos colaterais, a oxamniquina foi, ao poucos, substituída pelo praziquantel no tratamento de todos os tipos de esquistossomose (VITORINO; SOUZA; COSTA, 2012).

O PZQ é um derivado do núcleo isoquinolínico-pirazínico de amplo espectro anti-helmíntico. Fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose, ele é ativo sobre todas as espécies de *Schistosoma*. Nas concentrações mínimas eficazes, o PZQ causa aumento da atividade muscular, seguido de contração e paralisia espástica. O corpo do verme

fica imobilizado e sua ventosa oral apresenta movimentos fracos. Assim, os parasitas destacam-se dos vasos sanguíneos e são levados das veias mesentéricas para o fígado. O praziquantel também atua na permeabilidade do  $\text{Ca}^{2+}$ , causando influxo desse íon para o interior do tegumento do parasita, provocando vacuolização e destruição tegumentar. Isso expõe vários antígenos tegumentares que são detectados pelo sistema imune (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; TRACY, JW ; WEBSTER, 2011; VITORINO; SOUZA; COSTA, 2012; WU; WANG; HUANG, 2011). A cura no tratamento com PZQ fica entre 60-90%, juntamente com a relevante diminuição da carga parasitária e da produção de ovos pelos vermes (VITORINO; SOUZA; COSTA, 2012). Assim, a alta eficiência, o largo espectro de atividade, a excelente tolerância dos indivíduos ao fármaco, os poucos e transitórios efeitos colaterais, a forma simples de administração e o baixo custo fazem do praziquantel a única droga de escolha para o tratamento da esquistossomose humana (WU; WANG; HUANG, 2011).

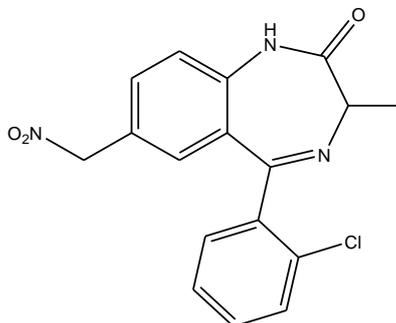
As estratégias de tratamentos medicamentosos são bastante eficazes de forma imediata, porém trazem consigo algumas preocupações de execução (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; TRACY, JW ; WEBSTER, 2011):

- Primeiro, inevitavelmente, o tratamento não chegará a todas as pessoas;
- Segundo, indivíduos tratados podem não ser curados;
- Terceiro, eles não interrompem a transmissão, fazendo da re-infecção uma realidade.

Uma vez que o PZQ é o único medicamento esquistossomicida disponível, aflora a preocupação do possível surgimento de parasitas resistentes a ele, podendo extinguir o seu uso (PICA-MATTOCCIA et al., 2009; SADHU et al., 2012). Esse fato é ainda mais preocupante porque de 1556 fármacos comercializados no período de 1975 a 2004, apenas quatro deles foram desenvolvidos para tratar helmintíases, sendo um deles o praziquantel que já é utilizado há 20 anos como único tratamento para esquistossomose. Somadas com a dietilcarbазina e o mebendazol, essas seis substâncias são praticamente todo o arsenal disponível para combater essas infecções (HOTEZ et al., 2008). Recentemente, foi divulgada a descoberta de uma vacina contra o *S. mansoni* desenvolvida pela Fundação Oswaldo Cruz. Ela já está em fase de pesquisa clínica e espera-se que em até 3 a 4 anos seja possível imunizar toda a população dos locais endêmicos (VEJA.COM, 2013).

Somando-se à pesquisa da vacina, têm-se os estudos acerca do meclonazepam (Figura 6), um derivado benzodiazepínico que apresentou acentuada atividade contra todos os

estágios do *S. mansoni* e *S. haematobium*. No entanto, o seu uso na terapêutica é impedido devido aos seus efeitos adversos que incluem diminuição das funções psicomotoras, sedação e ataxia.



**Figura 6 – Estrutura do Meclonazepam.**

O mecanismo de ação proposto para essa molécula é similar ao do PZQ, no qual há o influxo de cálcio, porém isto vem sendo motivo de discordância e debate entre os pesquisadores (MAHAJAN et al., 2008; MENEZES et al., 2012).

O atual panorama de controle e tratamento da esquistossomose revela uma situação potencialmente perigosa que aponta para a necessidade da identificação de novas substâncias esquistossomicidas eficazes (MELMAN et al., 2009; PICA-MATTOCCIA et al., 2009; SADHU et al., 2012). Em relação ao controle dos caramujos, deve ser avaliada uma gestão ambiental adequada quanto ao uso de moluscicidas químicos. Os seus altos custos e efeitos ambientais perigosos, juntamente com a possibilidade de desenvolvimento de resistência do molusco, conduz a realização de pesquisas para descoberta de alternativas mais baratas e seguras (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; PICA-MATTOCCIA et al., 2009; SADHU et al., 2012). Com base nessa necessidade, antigos compostos biologicamente ativos têm sido investigados como uma estratégia alternativa para o descobrimento de novas substâncias terapêuticas, como por exemplo, as quinonas e seus derivados.

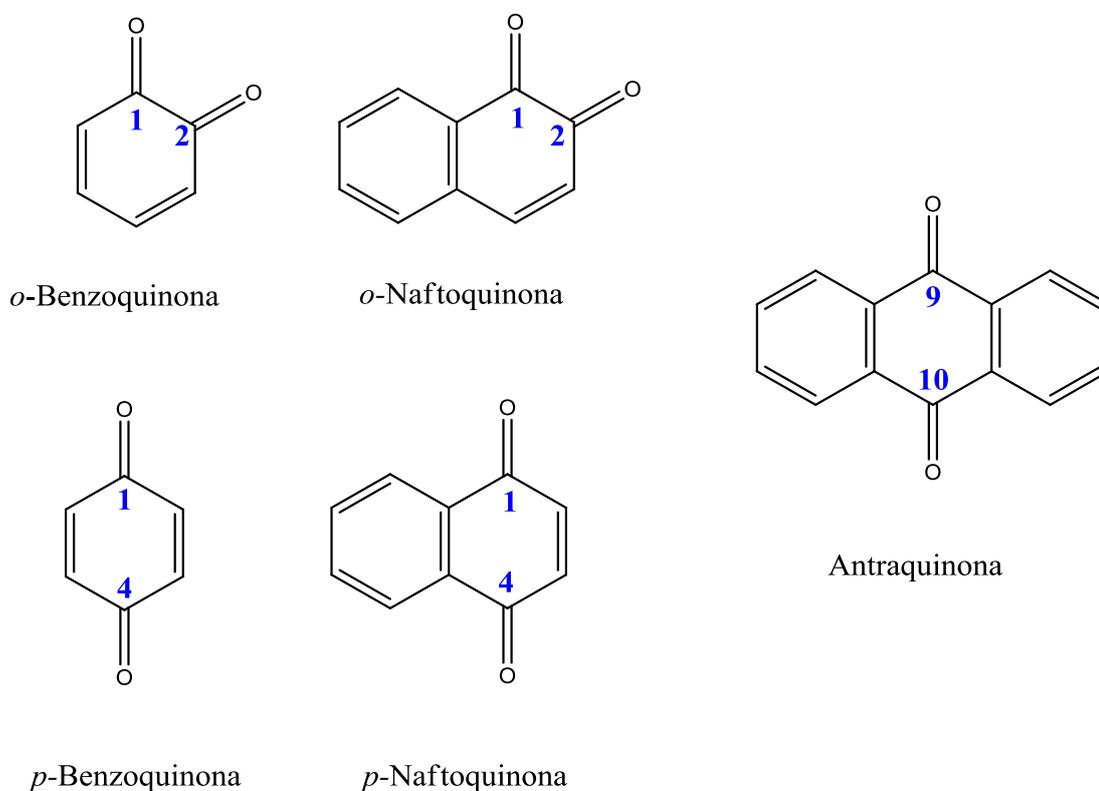
### 3.3 Quinonas

As quinonas são um exemplo de compostos de origem natural que têm inspirado bastante interesse devido ao excelente e diversificado potencial farmacológico que apresentam (FERREIRA et al., 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Nos últimos anos, moléculas dessa classe vêm se destacando como possíveis candidatas contra as DTNs como a leishmaniose, a doença de chagas e contra moluscos da espécie *Biomphalaria*

*glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Por esse motivo, tem estimulado a realização de novas pesquisas na comunidade científica (BOURGUIGNON et al., 2011; DE MOURA et al., 2004; MENNA-BARRETO et al., 2010; SILVA et al., 2005).

Representantes de uma família de metabólitos secundários, as quinonas estão amplamente difundidas na natureza participando de etapas que compreendem desde as cadeias de respiração celular à fotossíntese, entre outros processos bioquímicos dos seres vivos (THOMSON, 1991).

As quinonas possuem diversas estruturas moleculares e podem ser classificadas de três formas quanto à estrutura aromática que sustenta o anel quinoidal (Figura 7) (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Benzoquinonas (têm um anel benzoquinônico), Naftoquinonas (possuem sistema aromático derivado do naftaleno) e Antraquinonas (contém estrutura derivada do antraceno). Em relação a posição das carbonilas no anel quinoidal, podem ser classificadas como *orto*-naftoquinonas, quando as carbonilas estão localizadas nas posições 1 e 2, e *para*-naftoquinonas quando as carbonilas estão nas posições 1 e 4.

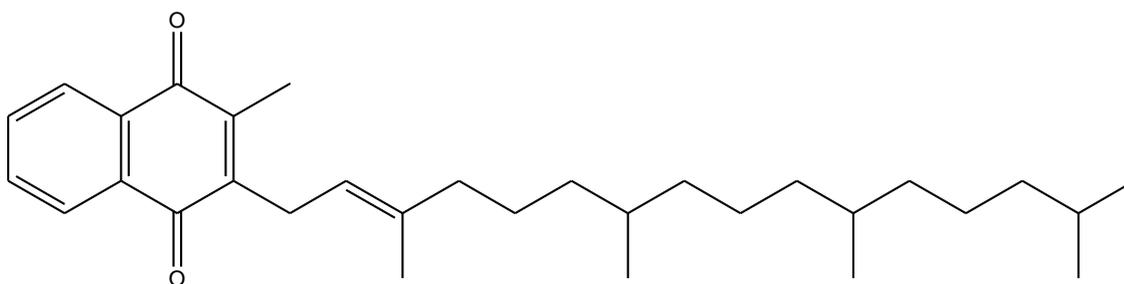


**Figura 7 – Classificação das quinonas quanto à estrutura aromática e posição das carbonilas.**

### 3.2.7 Naftoquinonas

As naftoquinonas são compostos dicetônicos que possuem uma unidade naftalênica na sua estrutura. Dos três grupos de quinonas citadas, atualmente, elas são as mais relatadas em estudos científicos devido as suas atividades biológicas, principalmente contra o câncer e o *Trypanossoma cruzi*, vetor da Doença de Chagas. As naftoquinonas integram o grupo de moléculas de origem natural que fazem parte do metabolismo secundário das plantas e são encontradas no cerne de árvores *Tabebuia sp*, da família Bignoneacea, conhecidas popularmente por ipês (DE MOURA et al., 2004; FERREIRA et al., 2009).

Dentre a gama de atividades biológicas conhecidas destacam-se a antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, moluscicida, tripanocida, leishmanicida, anti-inflamatória, inibidoras da topoisomerase, inibidora da transcriptase reversa (FERREIRA et al., 2010). Além disso, são essenciais na bioquímica de muitos seres vivos. Um exemplo é a vitamina K que é responsável pelo controle da coagulação sanguínea (Figura 8) (MENNA-BARRETO et al., 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

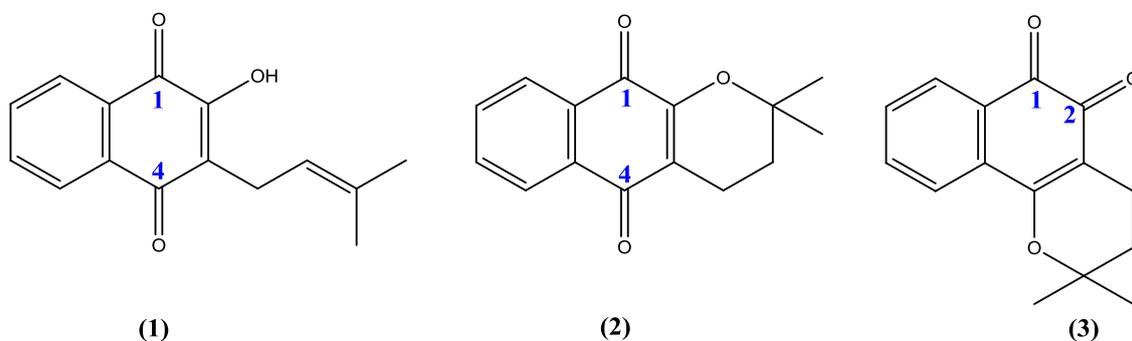


**Figura 8 – Estrutura da Vitamina K.**

Do ponto de vista estrutural, as naftoquinonas podem ser classificadas em *orto*-naftoquinonas e *para*-naftoquinonas, quando as carbonilas estão nas posições 1,2 ou 1,4 do anel naftalênico, respectivamente. A reatividade desta porção quinonóica da molécula é o foco principal dos estudos científicos para a produção de novos derivados farmacologicamente ativos (FERREIRA et al., 2010).

Dentre todas as moléculas desse grupo, as que mais se destacam na literatura são o lapachol,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona (Figura 9) (FERREIRA et al., 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). O lapachol é o mais abundantemente encontrado nas árvores da família Bignoneacea e o que apresenta a extração com rendimentos mais satisfatórios através da serragem da madeira (DE MOURA et al., 2004; HOOKER, 1892) (Esquema 2). A fácil

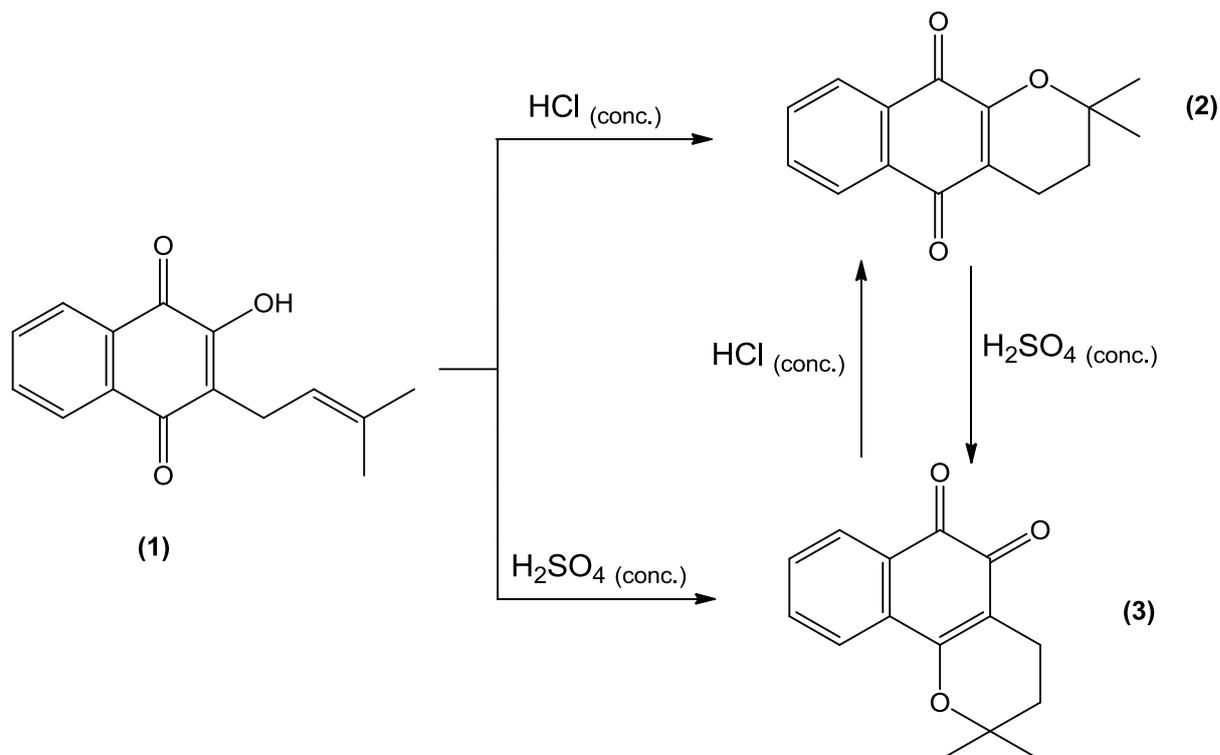
extração do lapachol pode ser explicada por sua acidez, ou seja, quando o mesmo está na forma ácida se apresenta como sólido amarelado e insolúvel em água, porém quando assume a forma de sal exibe grande solubilidade em água (cor avermelhada). Portanto pode ser extraído com facilidade através da utilização de solução alcalina (ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002; DA SILVA JÚNIOR et al., 2009; OSSOWSKI et al., 2008).



**Figura 9 – Estruturas do Lapachol (1),  $\alpha$ -lapachona (2) e  $\beta$ -lapachona (3).**

A descoberta do lapachol data de 1858, sendo Arnaudon o primeiro pesquisador a isolá-lo. Anos depois, Paternò obteve quimicamente a  $\beta$ -lapachona e a  $\alpha$ -lapachona a partir do lapachol, utilizando ácido. Posteriormente, as três moléculas tiveram suas estruturas químicas elucidadas por Hooker, que também publicou trabalhos onde estabeleceu as condições reacionais para a síntese delas (Esquema 2), e estudou-as sob diversos parâmetros, deixando um legado bastante extenso (DA SILVA JÚNIOR et al., 2009; HOOKER, 1936, 1893, 1896; OSSOWSKI et al., 2008; THOMSON, 1991).

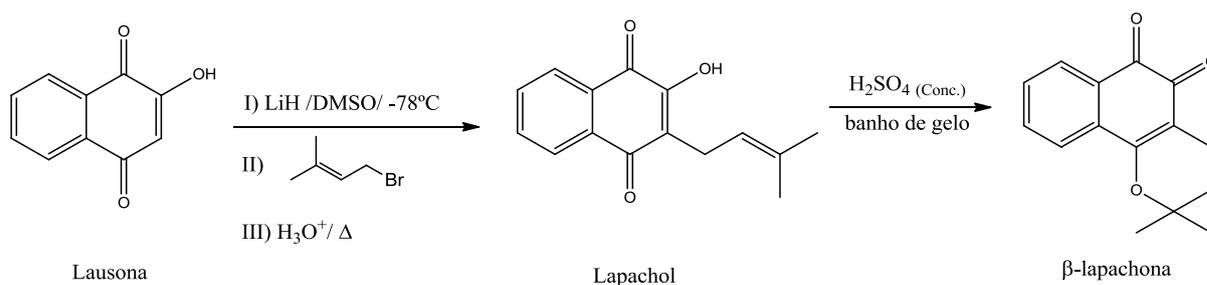
O lapachol e seus derivados  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona têm em comum diversas bioatividades, sendo as de mais destaque a anticancerígena e a antiparasitária (FERREIRA et al., 2009). Alguns mecanismos de ação já foram propostos para essas moléculas e há um consenso em relação ao perfil farmacológico que define as duas carbonilas do sistema quinonóico como peças centrais, pois têm a habilidade de aceitar um ou dois elétrons, formando as espécies ânion e diânion correspondentes, que induziriam o estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio (FERREIRA et al., 2009; SALAS et al., 2008; VERMA; HANSCH, 2004; WEI et al., 2009). Portanto, munidas de propriedades redox, seriam capazes de intervir em diversos processos biológicos oxidativos (DE MOURA et al., 2004).



**Esquema 2 – Obtenção da  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona a partir do lapachol (HOOKER, 1892).**

### 3.3 $\beta$ -lapachona

A  $\beta$ -lapachona é uma *orto*-naftoquinona derivada do lapachol, que também pode ser encontrada no cerne de árvores da espécie *Tabebuia*, porém em pequenas quantidades. Por isso, ela é comumente obtida por isomerização do lapachol que é extraído em maior abundância (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Outras reações de obtenção desta *orto*-naftoquinona são descritas na literatura. Um exemplo é a reação da lausona com haletos de alquila em DMSO, em presença de hidreto de lítio (LiH) e depois ácido, onde se obtém o lapachol. Então, ele é submetido a tratamento com ácido sulfúrico concentrado a frio, originando a  $\beta$ -lapachona (Esquema 3) (SCHAFFNER-SABBA et al., 1984).



**Esquema 3 – Síntese da beta-lapachona a partir da lausona.**

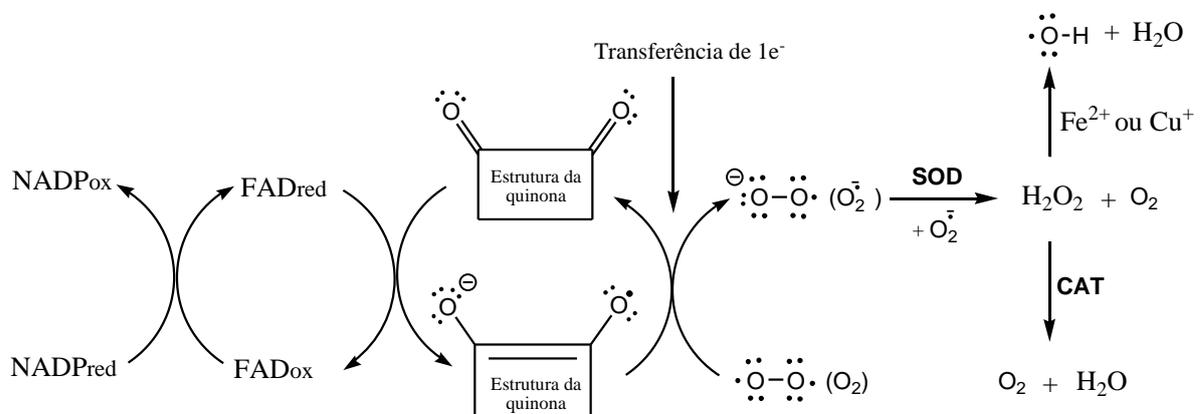
Assim como todas as moléculas da família das naftoquinonas, a  $\beta$ -lapachona também possui uma gama de atividades já citadas anteriormente. Entretanto, a elucidação do mecanismo da bioatividade desta molécula frente ao câncer e às formas evolutivas do *T.cruzi* vem sendo largamente discutida (BOURGUIGNON et al., 2011; DE MOURA et al., 2004; MENNA-BARRETO et al., 2010; SALAS et al., 2008; WEI et al., 2009).

Em relação ao câncer acredita-se que a  $\beta$ -lapachona possa agir, principalmente, de duas formas distintas, por inibição do sistema topoisomerase I e II e por estresse oxidativo (WEI et al., 2009).

- Inibição do sistema de Topoisomerases I e II
  - As topoisomerases são enzimas nucleares essenciais para a manutenção da integridade do DNA. Elas estão envolvidas nos processos de transcrição, replicação, recombinação, manutenção e reparo, agindo em pontos de checagem no momento da duplicação celular, catalisando mudanças topológicas no DNA que são essenciais para a progressão do ciclo celular normal. O bloqueio dessa ação reparadora induz a apoptose celular. A  $\beta$ -lapachona age como um inibidor catalítico das topoisomerases I e II, e age também através da indução de pontos de checagem artificiais durante o ciclo celular das células tumorais através da indução da proteína E2F1 que expressa genes que induzem ou regulam a divisão celular. Essas ações culminam na apoptose celular (BASSI; PALITTI, 2000; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).
- Estresse Oxidativo (FERREIRA et al., 2010; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003) (Esquema 4):
  - Este mecanismo de ação envolve a geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) induzidas pela biorredução do núcleo quinonoídico por enzimas específicas, que utilizam as coenzimas NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e o oxigênio molecular.
  - O estresse oxidativo no interior da célula vem da geração de espécies ânions radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Estas espécies, principalmente

( $\cdot\text{OH}$ ) e ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), causam danos irreversíveis a alguns componentes celulares, podendo levar a apoptose (morte celular programada).

- O Esquema abaixo mostra um resumo do ciclo redox das quinonas onde a porção quinonoídica sofre biorredução por um elétron, catalisada pelas enzimas NADPH (NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidorredutase) dentre outras, formando a espécie ânion radical semiquinona *in situ*.
- Na presença de oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), esse ânion radical transfere um elétron e gera o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) que por sua vez sofre a ação da enzima superóxido desmutase gerando peróxido de hidrogênio.
- A ação da enzima catalase transforma o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Paralelamente uma reação envolvendo metais e transição como o  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  produz o radical hidroxila.



**Esquema 4 – Oxidação de moléculas com porção quinonoídica adaptado de Ferreira e colaboradores, 2010.**

A ação sobre o *T. cruzi* também está baseada na capacidade redox da  $\beta$ -lapachona, que segundo Salas e colaboradores (2008), foi uma das primeiras substâncias que mostrou a evidência de estresse oxidativo gerado em parasitas. Também foi reportado, no mesmo estudo, que ela causa a inibição progressiva da motilidade da forma epimastigosta, além da inibição do seu crescimento *in vitro* (SALAS et al., 2008).

Em estudo recente, nosso grupo evidenciou que essa *orto*-naftoquinona apresenta atividade moderada contra o *S.mansoni* comparada ao medicamento de referência (PZQ).

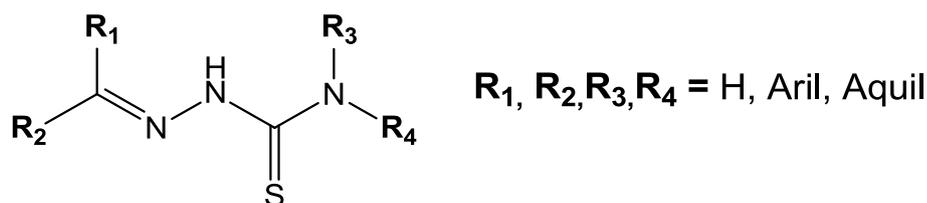
Além disso, ela exibe atividade em outras fases do ciclo biológico do parasita, feito não alcançado com o praziquantel, que só combate à forma adulta do verme (AIRES et al., 2014a). A atividade de uma preparação tópica de  $\beta$ -lapachona foi testada frente à cercárias do *S. Mansoni*, em caudas de ratos. A preparação apresentou bloqueio total da penetração das cercárias quando aplicada na cauda 24 horas antes da infecção (PINTO et al., 1977).

Contudo, apesar de todo esse potencial farmacológico, essa naftoquinona não é indicada para o tratamento sistêmico dessas parasitoses devido aos efeitos adversos causados por sua alta toxicidade em células de mamíferos. Entretanto, isto abre um leque de novas possibilidades para a pesquisa e síntese de derivados da  $\beta$ -lapachona, visando o aumento da atividade e a diminuição da toxicidade em humanos (AIRES et al., 2014a; LINDOSO; LINDOSO, 2009b).

Atualmente, os químicos investem nas modificações moleculares no centro quinonóidico no qual se sabe que está centrado o perfil farmacológico da molécula (BOURGUIGNON et al., 2011). Assim como é de conhecimento científico que a capacidade de redução da  $\beta$ -lachona e das outras quinonas, é uma condição importante para seu mecanismo de ação (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Isto demonstra a importância da escolha correta dos substituintes a serem incluídos na  $\beta$ -lapachona. Há trabalhos que reportam a produção de derivados monossustituídos em C-6 ou heterociclo como naftoimidazóis, tendo este último apresentado aumento da atividade tripanocida em comparação com a  $\beta$ -lapachona (SALAS et al., 2008).

### 3.4 Tiossemicarbazonas

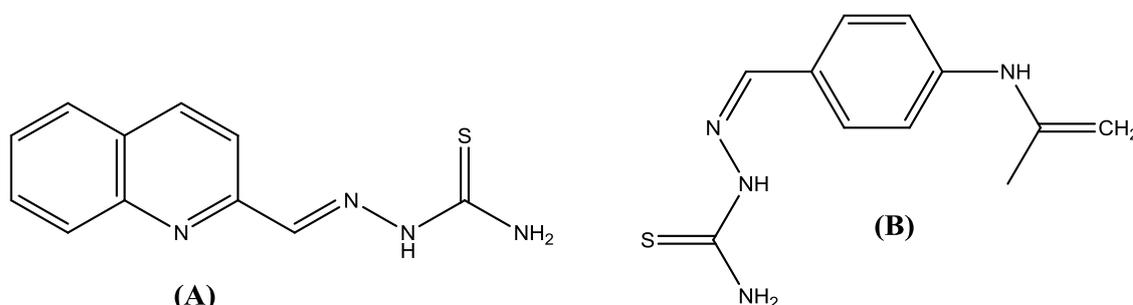
As tiossemicarbazonas (Figura 10) constituem uma classe importante de moléculas que têm sido estudadas nos últimos 50 anos pela sua versatilidade farmacológica (CAPUTTO et al., 2011; LESSA et al., 2010).



**Figura 10** – Estrutura geral das tiossemicarbazonas (GÓES; TENÓRIO, 2005a)

Os estudos são realizados tanto pela Química Medicinal, devido ao seu vasto leque de atividades biológicas notáveis, tais como, antiretroviral (RAWAL et al., 2007), antibacteriana (BERALDO; GAMBINO, 2004), antifúngica (EL-SHARIEF et al., 2013), antituberculose (BERALDO, 2004; PAVAN et al., 2010), antitoxoplasma (GÓES; TENÓRIO, 2005b), antitripanossoma cruzi (LEITE et al., 2006) e antitumoral (VANDRESEN et al., 2014), quanto pela Química Inorgânica Medicinal, por sua propriedade de agir como quelante (BERALDO, 2004), o que tem gerado vários trabalhos destas moléculas complexadas com diferentes metais como potenciais agentes anticâncer (FERRAZ et al., 2009) e antirretrovirais (PELOSI et al., 2010).

Ao longo dos anos, as tiossemicarbazonas têm servido de inspiração e base para a descoberta de novos fármacos, como a 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona (IQ-1), antineoplásico, e a tioacetazona (4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona), utilizado como tuberculostático principalmente na África, mesmo com suas limitações e efeitos colaterais, como a indução da diabetes mellitus durante o tratamento (Figura 11).



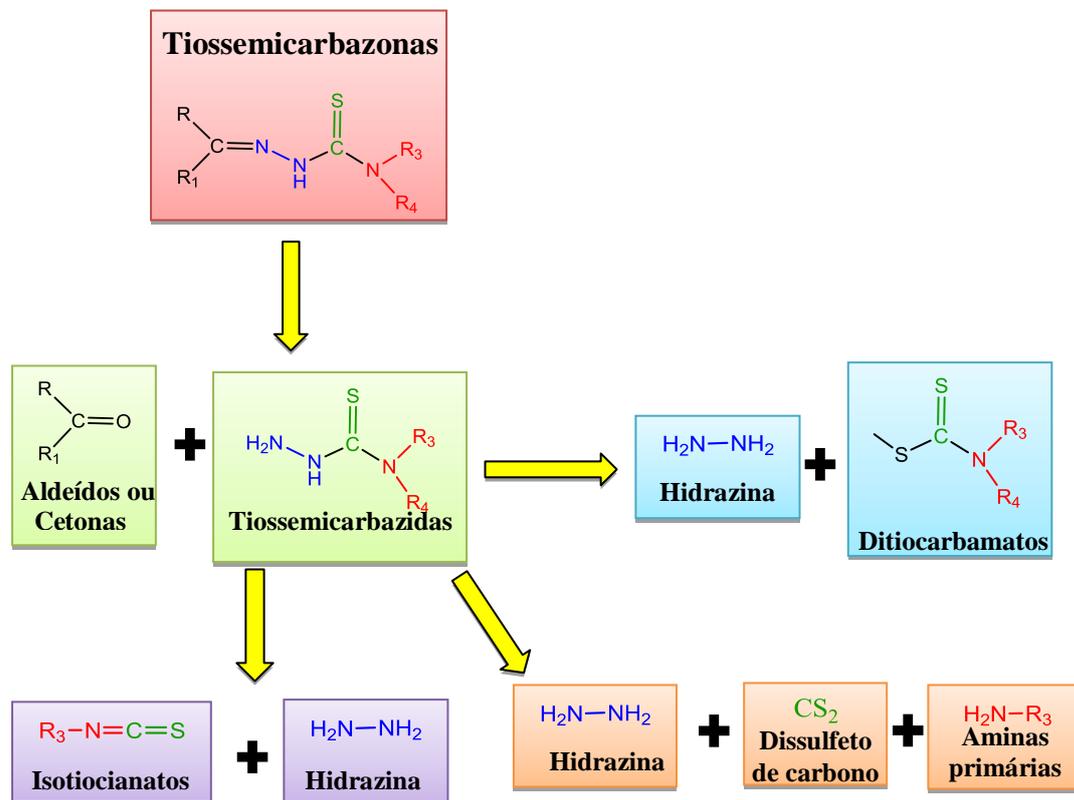
**Figura 11 – Estruturas da 1-formil-isoquinolina tiossemicarbazona (A) e da tioacetazona (B).**

O modo de ação das tiossemicarbazonas está relacionado com a inibição enzimática (ribonucleotídeo redutase) e reações redox com o DNA. Outros mecanismos ainda são desconhecidos (BERALDO, 2004).

### 3.4.1 Síntese de tiossemicarbazonas

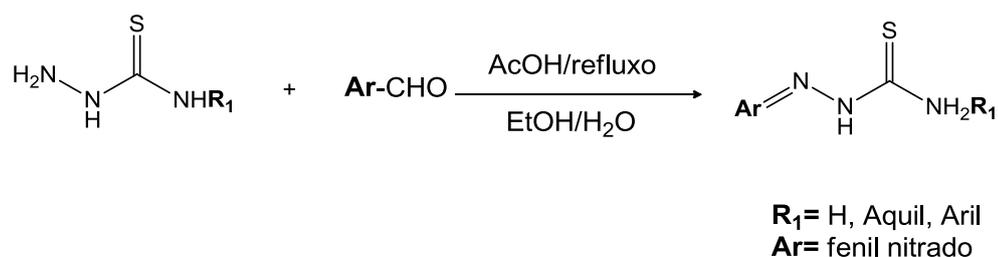
A síntese de tiossemicarbazonas é amplamente explorada e descrita na literatura. Na análise retrossintética visualizada no Esquema 5, duas estratégias podem ser empregadas: preparação direta das tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas e, preparação indireta, onde há uma obtenção prévia das tiossemicarbazidas,

utilizando como reagente comum a hidrazina ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ) e diferentes reagentes (isotiocianatos, ditiocarbamatos e dissulfeto de carbono com aminas primárias), seguida de condensação com o derivado carbonilado (Esquema 5) (GÓES; TENÓRIO, 2005a).



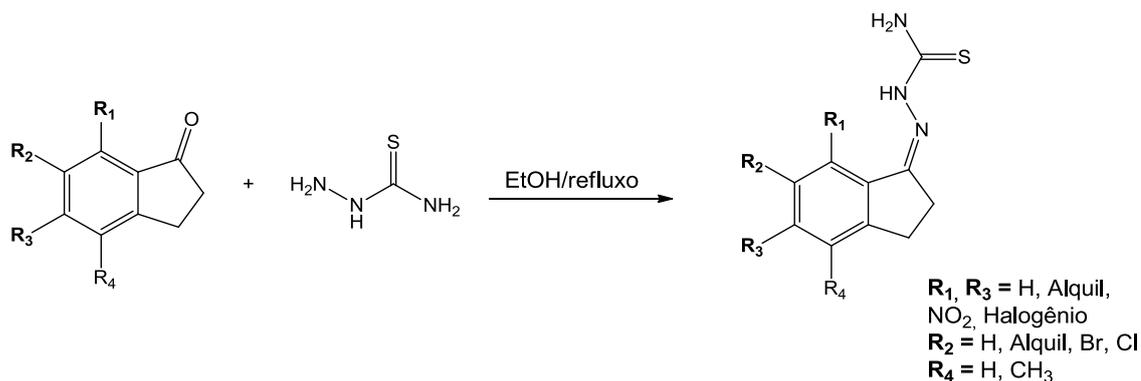
**Esquema 5 – Análise retrossintética das tiossemicarbazonas**

Góes e colaboradores (2005b) sintetizaram derivados da tiossemicarbazona, através da reação de benzaldeídos substituídos com a tiossemicarbazida em solução etanol/água com catálise ácida (ácido acético) (Esquema 6) (GÓES; TENÓRIO, 2005b).



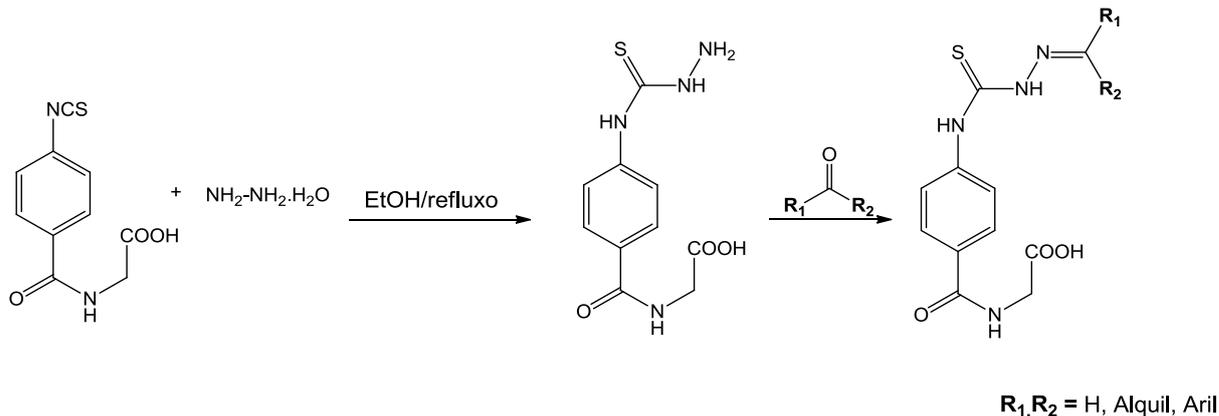
**Esquema 6 – Obtenção de derivados da tiossemicarbazona com catálise ácida.**

Variações desta reação utilizam apenas o etanol como solvente e/ou dispensam uso de catalisadores (Esquema 7) (CAPUTTO et al., 2011).



**Esquema 7 – Obtenção de derivados da tiossemicarbazona sem catálise.**

Outra forma de obtenção foi realizada por El-Sharief e colaboradores (2013), a síntese foi descrita em duas etapas (Esquema 8). Primeiro, obteve-se diversas tiossemicarbazidas através de uma reação entre hidrato de hidrazina e o isotiociano desejado. E a segunda etapa consistiu na reação citada anteriormente, a condensação da tiossemicarbazida com um derivado carbonilado.



**Esquema 8 – Obtenção de derivados da tiossemicarbazona por método indireto.**

Distintas formas de síntese das tiossemicarbazonas utilizando a hidrazina são descritas em revisão de Góes e colaboradores (2005a), como a reação com dissulfeto de carbono com aminas e hidrato de hidrazina, obtendo-se a tiossemicarbazida e, em reação posterior a tiossemicarbazona (GÓES; TENÓRIO, 2005a).

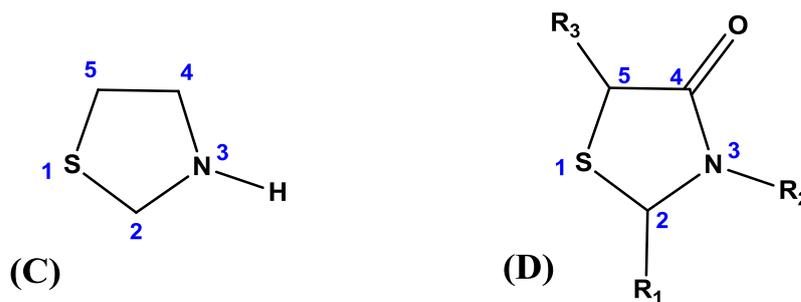
As tiossemicarbazonas são compostos bastantes versáteis quimicamente, possuindo diversas formas de síntese com bons rendimentos descritos, boa estabilidade o que facilita seu

manuseio e armazenamento. Isto proporciona a utilização desta classe como intermediários na síntese de vários núcleos importantes, como tiazol, 1,2,4-triazina, as 4-tiazolidinonas dentre outros.

### 3.5 Tiazolidinonas

As atividades de moléculas que possuem na sua estrutura heterocíclon de cinco membros, contendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio, já são estudadas há muito tempo. Porém ainda são objeto de muito interesse devido a gama de atividades biológicas que elas apresentam, o que está relacionado com a capacidade delas de interagir biologicamente de diversas formas (HU et al., 2013; MUSHTAQUE; AVECILLA; AZAM, 2012).

Derivadas da tiazolidina (C), as tiazolidinonas (D) são um heterociclo de cinco membros que possuem dois heteroátomos, um enxofre na posição 1 e um nitrogênio na posição 3, e uma carbonila na posição 4 do anel (Figura 12). Os substituintes  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  podem ser de diferentes e variados grupos químicos. Entretanto, as substituições na posição 2 exercem diferença mais significativa em relação à estrutura e propriedades da molécula (LIESEN; AQUINO; GÓES, 2008; VERMA; SARAF, 2008).



**Figura 12 – Estruturas da tiazolidina (C) e da 4-tiazolidinona (D).**

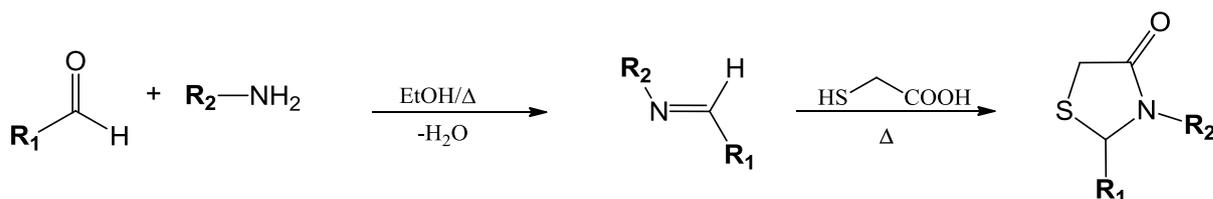
As 4-tiazolidinonas (4-TZD) são bastante versáteis quanto à atividade biológica. Já foram descritas na literatura como antifúngicas, antitumorais, anti-histamínicas, anti-inflamatórias, anti-helmínticas e, principalmente antibacterianas como potencial inibidora da enzima Mur B (N-acetilglucosamina redutase) que é fundamental no processo de biossíntese do peptidoglicano, constituinte da parede celular das bactérias (LIESEN; AQUINO; GÓES, 2008; ZHANG et al., 2009).

### 3.5.1 Métodos de síntese de 4-tiazolidinonas

Existem na literatura diversas metodologias para a síntese do anel da 4-tiazolidinona. Isto demonstra a intensa busca de protocolos mais simples e efetivos, que proporcionem reações mais rápidas, limpas, de fácil purificação e com bons rendimentos (ZHANG et al., 2009).

Dentre as diversas formas de obtenção das 4-TZDs, têm-se as reações de condensação *one-pot* de três-componentes, onde a reação ocorre em apenas um balão contendo as três substâncias, neste caso, uma amina primária, um aldeído e ácido mercaptoacético. Benzeno e tolueno são usados como solventes, sob refluxo, com o aparato de Dean Stark ou peneiras moleculares utilizados para remover a água formada *in situ*, possibilitando o término da reação. Para esta mesma metodologia, ainda são descritas na literatura a utilização de cloreto de zinco ou sulfato de sódio com agentes dessecantes (LIESEN; AQUINO; GÓES, 2008; ZHANG et al., 2009).

O esquema da reação de condensação *one-pot* de três-componentes tem início com o ataque do nitrogênio da amina à carbonila do aldeído formando uma imina. Então, a imina sofre um ataque nucleofílico do enxofre, e em seguida há a ciclização intramolecular e eliminação de água (Esquema 9) (JAIN et al., 2012).

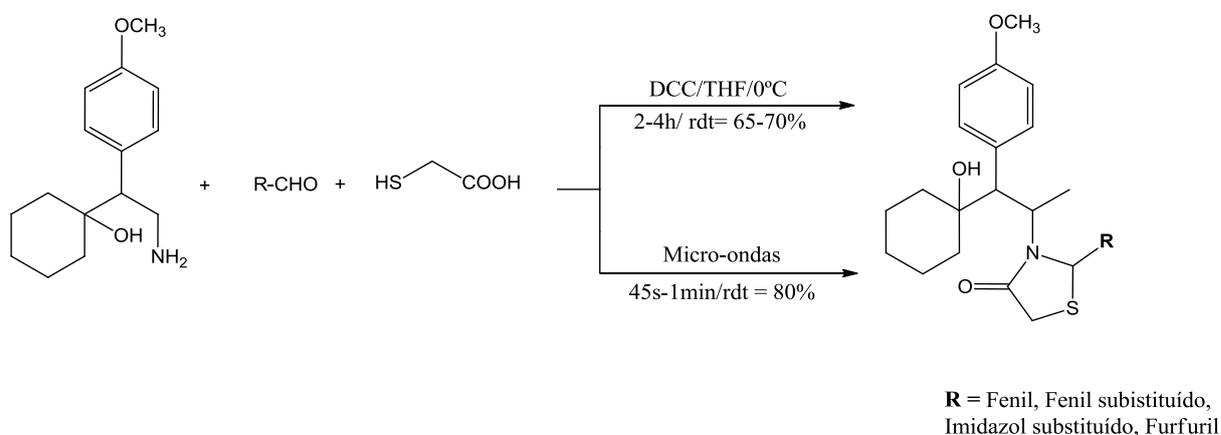


**Esquema 9 – Condensação *one-pot* de três componentes para síntese de derivados da 4-tiazolidinona.**

Srisvastava e colaboradores (2002) propuseram outro protocolo para a reação *one-pot* de três componentes. Eles utilizaram DCC (*N,N*-diciclohexilcarbodiimida) com o objetivo de acelerar a ciclização intramolecular e, como solvente, THF a 0°C, pois foi observado que a adição em baixas temperaturas do DCC conduz a melhores rendimentos do que quando realizada em temperatura ambiente. No meio reacional, o DCC é convertido em DCU que precipita e é removido por filtração. Esta metodologia apresenta diversas vantagens como o

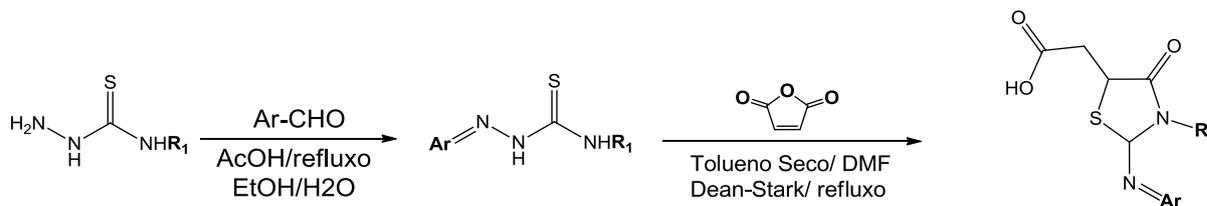
tempo de reação curto (menor que 1h) e formação do produto com rendimento quase quantitativo (Esquema 10) (SRIVASTAVA; HAQ; KATTI, 2002).

Kavitha e colaboradores (2006) propuseram outro método para obtenção de 4-TZD a partir de 1-[2-amino)-1-(4-metoxifenil)-etil]-ciclohexano, aldeídos ou cetonas e ácido mercaptoacético em THF, inserindo os parâmetros de reações assistidas por micro-ondas. Foram comparadas no trabalho, a reação convencional *one-pot* de três componentes em THF com adição de DCC com a reação assistida por micro-ondas com a finalidade de obter as mesmas 4-TZD (Esquema 10). Os resultados foram bastante expressivos tanto em relação ao tempo reacional quanto em relação ao rendimento. A reação tradicional foi realizada em 2-4 h com rendimento variando entre 65-70%, enquanto a assistida por micro-ondas obteve uma otimização do tempo reacional para 45s-1min e seus produtos apresentaram rendimentos superiores a 80% (KAVITHA et al., 2006).



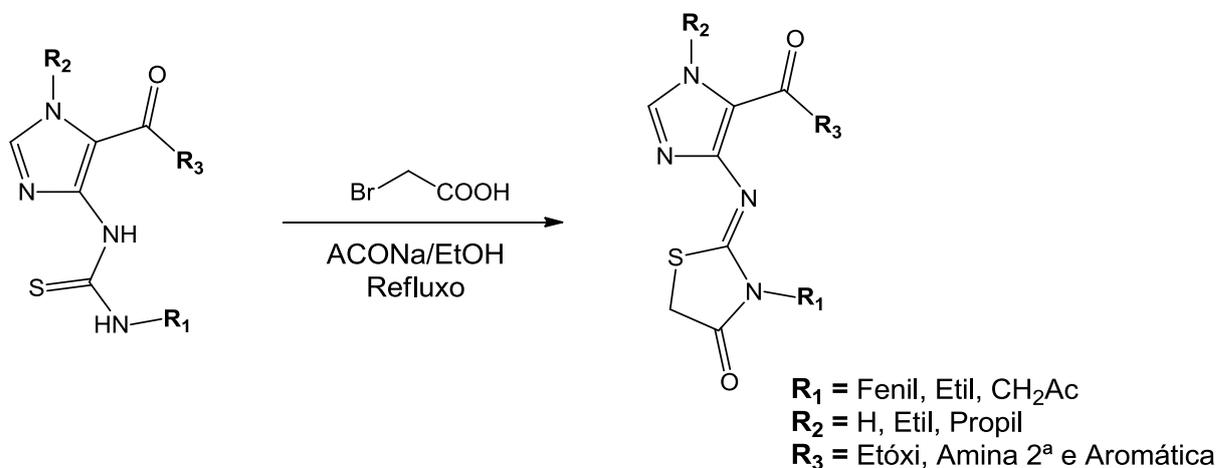
**Esquema 10 – Obtenção *one-pot* de 4-tiazolidinonas com DCC pelos métodos convencional e por irradiação de micro-ondas.**

Outro procedimento para formação de 4-tiazolidinonas foi descrito a partir da reação entre nitrobenzaldeído-tiossemicarbazonas substituídos e anidrido maléico (Esquema 11), utilizando como solvente o tolueno seco, sob refluxo (GÓES; TENÓRIO, 2005a).



**Esquema 11 – Obtenção de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas substituídas.**

El'tsov e colaboradores (2003) apresentam a condensação de derivados da tiouréia com ácido bromoacético (Esquema 12) para a síntese de 4-tiazolidinonas (EL'TSOV et al., 2003).



**Esquema 12 – Obtenção de 4-tiazolidinonas a partir de derivados da tiouréia.**

Embora hajam vários métodos descritos para síntese de tiazolidinonas, estudos ainda devem ser realizados a fim de desenvolver metodologias cada vez mais efetivas, fáceis, rápidas, de baixo custo e de melhores rendimentos (EL'TSOV et al., 2003; KAVITHA et al., 2006; LIESEN; AQUINO; GÓES, 2008; ZHANG et al., 2009).

### **3.6 Química de micro-ondas**

A química de micro-ondas (MO) avançou de modo significativo com o decorrer dos anos, particularmente à aplicada a química medicinal e orgânica (KAPPE; LARHED, 2005). Na década de 1950, a irradiação por micro-ondas era utilizada de forma esporádica em pesquisas científicas (KAPPE; DALLINGER, 2006). Em 1986, os grupos de Gedye e Giguere, independentemente, relataram pela primeira vez em trabalhos científicos o uso, de forma positiva, do micro-ondas em reações orgânicas. Porém, nesta época os experimentos eram realizados em fornos de MO domésticos que não dispunham de nenhum mecanismo para o controle das reações. Assim, os riscos ligados a inflamabilidade dos solventes orgânicos somados com a falta de controle dos parâmetros reacionais e variabilidade dos resultados pelo uso de modelos diferentes de fornos, tornaram praticamente inviáveis a

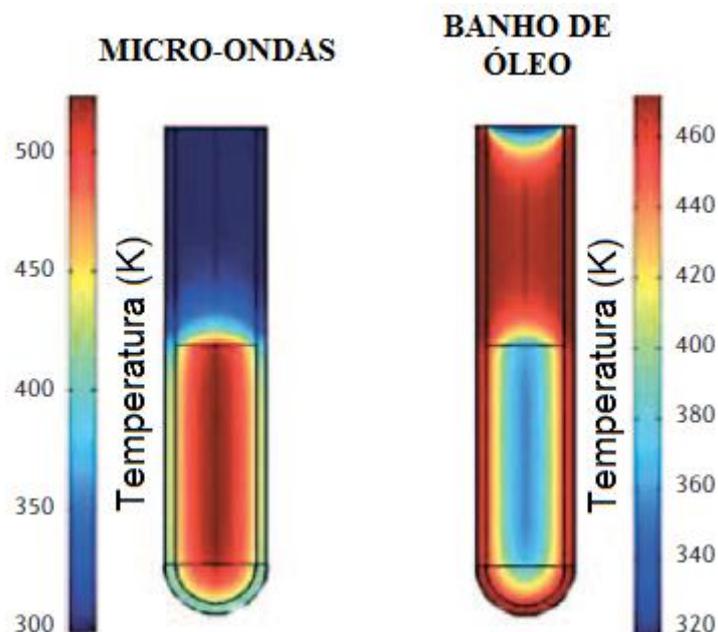
reprodução das novas metodologias descobertas (ADAM, 2003; GEDYE et al., 1986; GIGUERE et al., 1986; KAPPE, 2004).

Apesar de todos esses inconvenientes, aos poucos a irradiação por MO passou de uma curiosidade para um método consolidado, a partir do momento em que as noções básicas da sua forma de aquecimento foram estudadas e difundidas pela comunidade científica (KAPPE; DALLINGER, 2006).

### 3.6.1 Aquecimento por micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes localizadas entre a região do infravermelho e das ondas de rádio, que corresponde à faixa de 300 a 300.000 MHz, no espectro eletromagnético. Seu comprimento de onda varia de 1 mm a 1 m (FORTUNY; RAMOS; DARIVA, 2008).

O aquecimento por micro-ondas é distinto do convencional, que é amplamente disseminado e utilizado na maioria das metodologias de síntese (Figura 13).



**Figura 13 – Diferença de temperatura entre o aquecimento convencional e o aquecimento por irradiação de micro-ondas.**

No aquecimento convencional, a energia, já em forma de calor, é transferida para o meio reacional através das paredes das vidrarias utilizadas nos banhos de óleo e mantas de aquecimento. A dissipação desse calor no meio reacional ocorre por condução, que acontece de forma lenta e irregular. Isto culmina, geralmente, em áreas superaquecidas (perto das

paredes da vidraria) que podem originar produtos indesejáveis, e em áreas sub-aquecidas, onde o calor não está atingindo níveis efetivos (KAPPE; LARHED, 2005; LIDSTRÖM; TIERNEY; WATHEY, 2001).

Por outro lado, no aquecimento por MO, há o aquecimento interno direto da reação não havendo interferência dos recipientes durante o aquecimento. Esse tipo de aquecimento também é chamado de dielétrico, e pode ocorrer de duas formas: rotação de dipolo e condução iônica (KAPPE, 2004).

#### ***3.6.1.1 Rotação de dipolo***

Neste mecanismo, o aquecimento está relacionado com a resposta das substâncias ao campo elétrico gerado pelo reator de micro-ondas. As moléculas se dispõem de forma desordenada no meio reacional, porém quando campo é aplicado, as que possuem dipolos permanentes ou induzidos, tendem a se alinhar com o campo. Por sua vez, quando ele é removido, elas voltam à desorientação, e liberam energia anteriormente absorvida para o alinhamento em forma de calor. Como o campo elétrico oscila sua direção de acordo com a sua frequência, com consequente alteração de sinal, as moléculas tendem a acompanhar essas mudanças. Como resultado, tem-se o aumento da energia cinética e, por conseguinte, o aquecimento do meio reacional. (FORTUNY; RAMOS; DARIVA, 2008; KAPPE, 2004; LIDSTRÖM; TIERNEY; WATHEY, 2001).

De forma geral, as moléculas mais polares costumam absorver melhor micro-ondas em relação às apolares ou com momento de dipolo quase igual a zero (SANSEVERINO, 2002).

#### ***3.6.1.2 Condução Iônica***

Os íons se movimentam no meio reacional em relação a um campo eletromagnético aplicado. Durante essa movimentação, há o atrito entre os íons que gera correntes elétricas as quais resultam na produção de calor e, consequentemente aquecimento da amostra. Neste mecanismo, quanto maior for a concentração iônica, maior será o percentual de aquecimento (FORTUNY; RAMOS; DARIVA, 2008; KAPPE, 2004; LIDSTRÖM; TIERNEY; WATHEY, 2001).

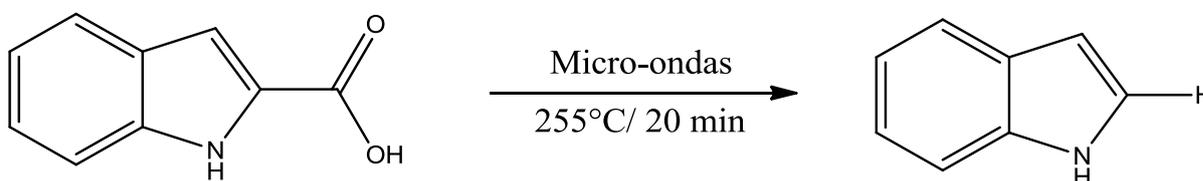
### 3.6.2 Reações em micro-ondas

A síntese orgânica assistida por micro-ondas tem sido objeto de interesse de pesquisadores do mundo inteiro nos últimos anos. A promessa de reações mais rápidas e efetivas e assim o melhoramento das metodologias tem servido de estímulo à produção de trabalhos científicos (ALVES et al., 2010).

Diversas reações já foram realizadas em reatores de micro-ondas como reações de descarboxilação, condensação, substituições nucleofílicas em sistemas aromáticos entre outras (LIDSTRÖM; TIERNEY; WATHEY, 2001; SANSEVERINO, 2002).

#### 3.6.2.1 Reação de descarboxilação

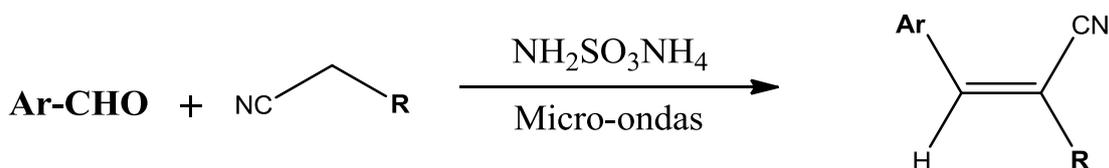
A reação ocorre de forma fácil e eficaz, utilizando-se a água como solvente e com ausência de catalisador (Esquema 13) (SANSEVERINO, 2002).



Esquema 13 – Descarboxilação do ácido 2 – indol-carboxílico.

#### 3.6.2.2 Reação de Condensação

A reação é sem solvente e o tempo varia de 5-20 segundos de acordo com o aldeído aromático e substituinte R utilizado (Esquema 14). Os rendimentos obtidos ficaram entre 92-99%, considerados, portanto, satisfatórios (MOGILIAIAH et al., 2010).

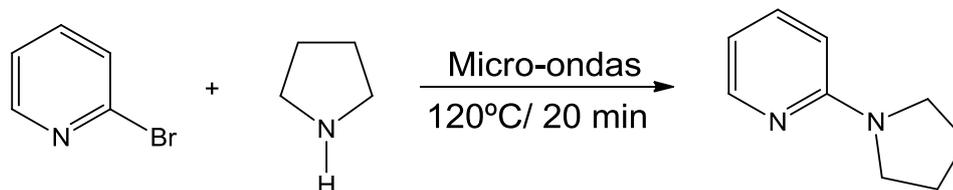


**Ar** = Fenil, fenil substituído,  
furano substituído  
**R** = nitrila, éster etílico, amida

Esquema 14 – Condensação de aldeídos aromáticos com compostos de metileno ativos na presença de sulfamato de amônio.

### 3.6.2.3 Reação de Substituição Nucleofílica Aromática

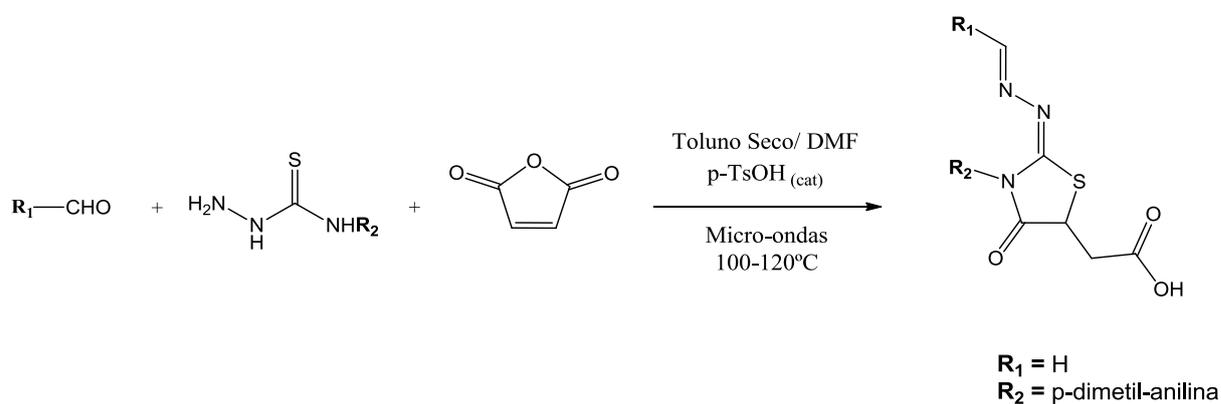
A reação de substituição nucleofílica aromática da 2-bromopiridina foi executada com a metodologia de micro-ondas em reação livre de solvente, obtendo um rendimento de 92% (Esquema 15) (PICHOWICZ et al., 2010).



Esquema 15 – Acoplamento da 2-bromopiridina com a pirrolidina.

### 3.6.2.4 Síntese de 4-tiazolidinonas substituídas

Baseando-se no trabalho de Góes e colaboradores (2005), Saiz e colaboradores (2009), após experimentos explorando diferentes tipos de solventes e variando os equivalentes reacionais, propuseram um procedimento para a obtenção do composto 2-hidrazolil-4-tiazolidinona sob aquecimento de micro-ondas (Esquema 16). A reação foi realizada utilizando-se tiossemicarbazida, benzaldeído, como solvente uma mistura 1:1 de tolueno e DMF, o ácido *p*-tolueno-sulfônico (*p*-TsOH) como catalisador e anidrido maléico em excesso com aquecimento de 100-120 °C (SAIZ et al., 2009).



Esquema 16 – Obtenção de 2-hidrazolil-4-tiazolidinona.

### 3.6.3 Benefícios da utilização do reator de micro-ondas em síntese orgânica

Desde os primeiros trabalhos publicados com a inserção do MO na sua metodologia, apesar de todos os problemas enfrentados pelos cientistas da época, percebeu-se as vantagens

da utilização deste equipamento. Com decorrer dos anos e a evolução da tecnologia e do conhecimento sobre esse equipamento, a maioria das dificuldades foram superadas e os benefícios continuaram a crescer, como por exemplo (ADAM, 2003; ALVES et al., 2010; FORTUNY; RAMOS; DARIVA, 2008; GEDYE et al., 1986; GIGUERE et al., 1986; JAIN et al., 2012; KAPPE; DALLINGER, 2006; KAPPE, 2004; LIDSTRÖM; TIERNEY; WATHEY, 2001; MOGILIAIAH et al., 2010; PICHOWICZ et al., 2010; SAIZ et al., 2009; SANSEVERINO, 2002):

- Aquecimento uniforme e efetivo
- Menor formação de subprodutos ou produto de degradação
- Diminuição do tempo reacional
- Melhores rendimentos
- Maior seletividade
- Metodologias mais simples
- Possibilidade de reações livre de solventes

Atualmente, são produzidos reatores de micro-ondas específicos para síntese orgânica, os quais são providos de sistemas que controlam potência, tempo, temperatura além da pressão, propiciando um trabalho fácil e seguro. Com isso, as vantagens da utilização do aquecimento por micro-ondas em relação ao convencional são cada vez maiores.

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 Materiais

As reações de síntese das novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona foram realizadas no reator de Micro-ondas Discover da CEM Corporation.

Os solventes utilizados nas reações foram destilados. O acetato de etila, hexano e a água utilizados nos processos de purificação foram previamente destilados.

As análises em cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), contendo indicador para 254 nm. A visualização das manchas foi efetuada em lâmpada de U. V.

As colunas cromatográficas foram empacotadas com sílica gel 60 (230 –400 mesh) e eluídas sob pressão (Flash).

Os produtos sólidos tiveram seu ponto de fusão aferidos no aparelho FISATON® 431D.

Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C dos derivados **3a**, **3b**, **3e**, **3f**, **3g** e **3h** foram emitidos no Espectrômetro Bruker Avance® DRX-500 do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ou DMSO deuterado (Sigma-Aldrich®) e transferidas para tubos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 175 x 5 mm (Sigma-Aldrich®). O processamento dos espectros foi feito com auxílio do software MestReNova 9.0. Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C dos derivados **3c** e **3d** foram emitidos no equipamento da Varian Unity® 400MHz do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (DQF-UFPE). Os deslocamentos químicos de todos os derivados foram expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano para RMN<sup>1</sup>H. Os solventes utilizados nas análises foram o DMSO-*d* ou CDCl<sub>3</sub>-*d*.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio e aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier). As frequências de absorção foram expressas em cm<sup>-1</sup>.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos no equipamento micrOTOF II do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

## 4.2 Metodologias de Síntese

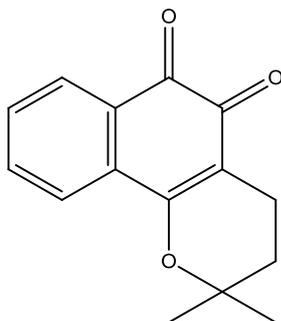
Nesta seção se encontram todos os procedimentos realizados para a síntese das novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona, assim como os dados físico-químicos e espectrométricos das moléculas.

### 4.2.1 Procedimento para a extração do Lapachol

Preparou-se uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, a qual 7,5 Kg de serragem de ipê-roxo (*Tabebuia sp.*) foram imersos. A solução vermelha resultante foi filtrada para remoção da serragem e, por fim, acidificada com ácido clorídrico. À medida que a solução foi acidificada, houve a precipitação de cristais amarelos do lapachol. A solução foi filtrada e os cristais secos. A cromatografia em camada delgada realizada comparando a amostra obtida com o padrão do lapachol confirmou que os cristais obtidos correspondiam ao lapachol. Obteve-se aproximadamente 2% de lapachol na forma de cristais amarelos.

### 4.2.2 Procedimento para a obtenção da $\beta$ -lapachona a partir do Lapachol

Em um balão contendo 35 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados ao poucos, sob banho de gelo e agitação magnética, 5 g de lapachol (20,66 mmoles). Obteve-se uma mistura vermelha escura, a qual foi mantida por 2 horas sob agitação e banho de gelo. A reação foi monitorada até o final por cromatografia em camada delgada (CCD) em sistema 8:2 (Hexano/ Acetato), ao qual o produto apresenta  $R_f = 0,47$ . Após as 2 horas, a mistura reacional foi vertida sobre um béquer com gelo e água, onde foi observada a precipitação de sólido alaranjado, que foi filtrado a vácuo e lavado com água. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh), com sistema 8:2 (Hexano/Acetato), seguido de recristalização em etanol. O produto foi caracterizado por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, Massa de alta resolução e IVFT.



- Dados reacionais
  - Cristais laranja
  - Rendimento: 85%;
  
- Dados físico-químicos e espectrofotométricos
  - **PM:** 242,1021 g/mol
  - **PF:** 161°C
  - **Rf:** 0,47 (Hexano/Acetato de etila 8:2)
  - **IVTF ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>, ATR):** 2978,18 (C-H, Aromático), 2934,07 (C-H, Alifático), 1693,83 (C=O), 1589,83 (C=C), 1114,51 (C-O-C, Assimétrica), 1092,20 (C-O-C, Simétrica).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  179,034 (C=O), 177,790 (C=O), 160,635 (C), 134,980 (CH-Ar), 132,065 (C-Ar), 130,805 (CH-Ar), 129,905 (C-Ar), 127,791 (CH-Ar), 123,663 (CH-Ar), 112,476 (C), 79,044 (C), 30,778 (CH<sub>2</sub>), 26,298 (2 CH<sub>3</sub>), 15,935 (CH<sub>2</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, DMSO):**  $\delta$  1,38 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,765 (t, 2H, J= 6,53 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,34 (t, 2H, J= 6,53 Hz, CH<sub>2</sub>), 7,54 (td, 1H, J= 7,77Hz; 4,44Hz, CH-Ar), 7,685 (d, 2H, J= 4,44 Hz, CH-Ar), 7,84 (d, 1H, J=7,77 Hz, CH-Ar).
  - **Solubilidade**
    - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>
    - Parcialmente solúvel: Etanol
    - Insolúvel: Água, Hexano

### **4.2.3 Procedimento geral para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona por irradiação por micro-ondas**

As reações foram realizadas utilizando a metodologia de obtenção direta a partir das tiossemicarbazidas e a metodologia de obtenção indireta, partindo da hidrazina e isotiocianatos para a obtenção das tiossemicarbazidas desejadas.

#### **4.2.3.1 Utilizando tiossemicarbazidas**

Em um tubo reacional de micro-ondas com capacidade para 10 mL, foram adicionados a  $\beta$ -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles) e 1 mL de Etanol. Sob agitação, adicionou-se ácido *p*-tolueno-sulfônico (80 mg/ 0,5 eq./ 0,42 mmoles) e mais 1 mL do solvente, obtendo-se uma mistura reacional laranja. Após 5 minutos de agitação, a tiossemicarbazida desejada (1,2 eq.) foi inserida no tubo juntamente com 3 mL de etanol. A mistura foi agitada o suficiente para homogeneização e, em seguida, irradiada no reator de micro-ondas por 5 minutos, a 120°C e numa potência de 100 W. Ela foi filtrada em filtro sinterizado, lavada três vezes (3x20 mL) com água e, depois, hexano e foi seca em estufa (37°C). O produto foi caracterizado por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, Massa de alta resolução e IVFT.

#### **4.2.3.2 Utilizando hidrato de hidrazina e isotiocianato**

Em um tubo de ensaio, foram adicionados a  $\beta$ -lapachona (150 mg/ 0,62 mmoles) e 3 mL de EtOH. Posteriormente, o ácido *p*-tolueno-sulfônico (118 mg/ 1 eq. / 0,62 mmoles), previamente dissolvido em 1 mL de EtOH, foi adicionado a tubo, sob agitação. Num tubo reacional, foi adicionada a hidrazina (116,25 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles), em seguida, sob agitação, o isotiocianato desejado (3eq./ 1,86 mmoles) foi gotejado e, por fim, 1 mL de EtOH foi inserido. Quando a mistura ficou esbranquiçada, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para o tubo reacional, juntamente com mais 2 mL de etanol absoluto. Agitou-se até completa homogeneização e irradiou-se no micro-ondas por 2 minutos, a 120°C (potência de 100 W). A reação foi filtrada, lavada três vezes com água e, posteriormente, hexano e foi seca em estufa (37°C). O produto foi caracterizado por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, Massa de alta resolução e IVFT.

#### 4.2.4 Procedimento geral para a obtenção das tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona por aquecimento convencional

As reações foram realizadas utilizando a metodologia de obtenção direta a partir das tiossemicarbazidas e a metodologia de obtenção indireta, partindo da hidrazina e isotiocianatos para a obtenção das tiossemicarbazidas desejadas.

##### 4.2.4.1 Utilizando tiossemicarbazidas

Num balão de fundo redondo foram adicionados a  $\beta$ -lapachona (200 mg/ 0,8264 mmoles) e 1 mL de etanol. Sob agitação, o ácido *p*-tolueno-sulfônico (80 mg/ 0,5 eq./ 0,42 mmoles) diluído em 1 mL de EtOH foi adicionado, seguido da tiossemicarbazida desejada (1,1 eq.) e 4 mL de etanol. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada até o final. Então, a reação foi filtrada em filtro sinterizado, lavada com água seguida de hexano, e seca em estufa (37°C).

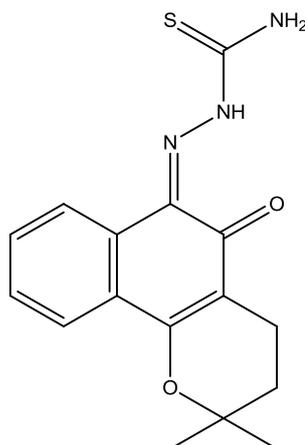
##### 4.2.4.2 Utilizando hidrato de hidrazina e isotiocianato

Em um tubo de ensaio, foi adicionada a  $\beta$ -lapachona (150 mg/ 0,62 mmoles) e 6 mL de EtOH e, sob agitação, o ácido *p*-tolueno-sulfônico (118 mg/ 1 eq./ 0,62 mmoles). Num balão, foi adicionada a hidrazina (116,25 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles) e, posteriormente, sob agitação, o isotiocianato desejado (3eq/ 1,86 mmoles) foi adicionado gota a gota. Quando a mistura do balão ficou espumosa e esbranquiçada, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para o balão, juntamente com mais 2 mL de etanol absoluto. A reação foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente e monitorada por CCD até o reagente ser totalmente consumido. Então, foi filtrada, lavada três vezes com água e hexano e o sólido amarelo foi seco em estufa (37°C). O produto foi caracterizado por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, Massa de alta resolução e IVFT.

#### 4.2.5 Dados dos compostos sintetizados

Nesta seção estão descritos os dados reacionais, físico-químicos e espectrométricos das oito novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona (**3a-3h**).

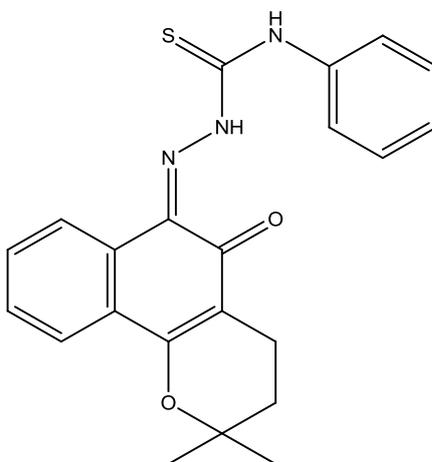
**4.2.5.1 Derivado 3a: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2Hbenzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método por irradiação em micro-ondas
  - **Reação com tiossemicarbazida**
    - Tiossemicarbazida: 40 mg/ 1,2 eq./ 0,44 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 94%
  
- Dados físico-químicos e espectrométricos
  - **PM:** 315,1526 g/mol
  - **PF:** 247°C
  - **Rf:** 0,47 (Hexano/Acetato de etila 8:2)
  - **IVTF ( $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  ATR):** 3416,38 (NH<sub>2</sub>, amina primária), 3232,28 (NH, amina secundária), 2974,66 (C-H, Aromático), 2931,78 (C-H, Alifático), 1593,28 (C=C), 1559,17 (C=N), 1512,07 (C=S), 1418,68 (N-C=S), 1113,03 (C-O-C, Assimétrica), 1100,22 (C-O-C, Simétrica), 1033,44 (C=S).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, DMSO):**  $\delta$  180,73 (C=S), 179,73 (C=O), 161,04 (O-C=), 131,03 (C=N), 129,97 (C-Ar), 129,18 (CH-Ar), 128,83 (C-Ar), 126,19 (CH-Ar), 124,17 (CH-Ar), 111,38 (C=C), 78,68 (O-C-), 30,76 (CH<sub>2</sub>), 26,27 (2 CH<sub>3</sub>), 15,74 (CH<sub>2</sub>).

- **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, DMSO):**  $\delta$  1,42 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,785 (t, 4H, J= 6,7 Hz, 2 CH<sub>2</sub>), 7,53 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,84 (m, 2H, 2 CH-Ar), 8,61 (m, 1H, CH-Ar), 9,00 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 9,25 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 14,90 (s, 1H, NH hidrazínico).
- **Solubilidade**
  - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, DMSO, Clorofórmio, Acetona, Diclorometano
  - Parcialmente solúvel: Etanol
  - Insolúvel: Água, Hexano

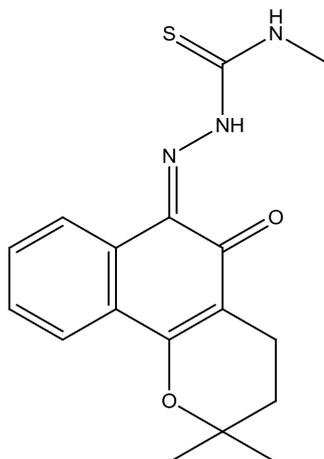
**4.2.5.2 Derivado 3b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método por irradiação por micro-ondas
  - **Reação com 4-feniltiossemicarbazida**
    - 4-feniltiossemicarbazida: 166 mg/ 1,2 eq./ 0,99 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 91%
  - **Reação com hidrazina e isotiocianato de 4-fenila**
    - Isotiocianato de 4-fenila: 251,5 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 62 %
    - Não foi utilizado o ácido *p*-tolueno-sulfônico

- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com hidrazina e isotiocianato de 4-fenila**
    - Isotiocianato de 4-fenila: 251,5 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 31 %
    - Tempo reacional: 5 dias
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 391,1726 g/mol
  - **PF:** 230-231°C
  - **Rf:** 0,5 (Hexano/Acetato de etila 9:1)
  - **IVTF ( $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  ATR):** 3302,15 (NH-Ar), 3050,16 (NH, amina secundária), 2983,11 (C-H, Aromático), 2923,25 (C-H, Alifático), 1593,83 (C=C), 1560,36 (C=N), 1519,74 (C=S), 1410,23 (N-C=S), 1126,75 (C-O-C, Assimétrica), 1099,48 (C-O-C, Simétrica), 1037,98 (C=S).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  181,24 (C=S), 176,4 (C=O), 162,44 (C), 137,67 (C=N), 131,23 (C-Ar), 131,2 (C-Ar), 129,89 (CH-Ar), 127,36 (C/CH), 126,35 (CH-Ar), 123,72 (CH-Ar), 122,64 (CH-Ar), 114,47 (C), 78,67 (C), 34,61 (CH<sub>2</sub>), 26,81 (2 CH<sub>3</sub>), 16,08 (CH<sub>2</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1,40 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,20 (m, 1H, CH-Ar), 7,38 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,22 (m, 2H, CH-Ar), 7,72 (m, 2H, CH-Ar), 7,92 (m, 2H, 2 CH-Ar), 9,67 (m, 1H, NH-Ar), 15,25 (s, 1H, NH hidrazínico).
  - Solubilidade
    - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>
    - Parcialmente solúvel: Etanol
    - Insolúvel: Água, Hexano

**4.2.5.3 Derivado 3c: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)-N-metil-hidrazina-carbotioamida**

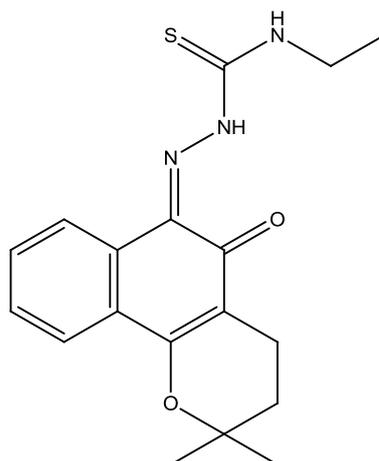


- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com 4-metil-tiossemicarbazida**
    - Metil-tiossemicarbazida: 217,26 mg/ 2,5 eq./ 2,06 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 77 %
    - Parâmetros do micro-ondas para **3c**: 130 °C, 120 W
    - Tempo reacional: 95 minutos
  
- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com 4-metil-tiossemicarbazida**
    - 217,26 mg/ 2,5 eq./ 2,06 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 51 %
    - Tempo Reacional: 2 dias
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM**: 329,42 g/mol;
  - **PF**: 234°C;
  - **Rf**: 0,53 (Hexano/Acetato de etila 8:2)
  - **IVTF ( $\nu$  cm<sup>-1</sup> ATR)**: 3329,21 (NH), 2985,71 (C-H, Aromático), 2927,24 (C-H, Alifático), 1613,62 (C=O), 1594 (C=C), 1560,52 (C=N), 1541,31 (C=S), 1441,53

(N-C=S), 1112,26 (C-O-C, Assimétrica), 1100,64 (C-O-C, Simétrica), 1039,59 (C=S).

- **RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  181,10 (C=S), 179,61 (C=O), 161,47 (C), 131,32 (C=N), 129,67 (CH-Ar), 129,15 (C-Ar), 128,59 (CH-Ar), 127,11 (C-Ar), 123,5 (CH-Ar), 122,66 (CH-Ar), 109,98 (C), 78,47 (C), 31,66 (CH<sub>2</sub>), 31,47 (CH<sub>3</sub>), 26,77 (2 CH<sub>3</sub>), 16,03 (CH<sub>2</sub>).
- **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1,44 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,83 (t, 3H,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2,56 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3,33 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,45 (m, 2H, CH-Ar), 7,88 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 8,01 (m, 2H, CH-Ar), 8,06 (m, 1H, NH hidrazínico)
- **Solubilidade**
  - Solúvel: Acetato de etila, Acetona, Clorofórmio, Diclorometano, DMSO, Acetonitrila, Metanol
  - Parcialmente solúvel: Etanol
  - Insolúvel: Água, Hexano

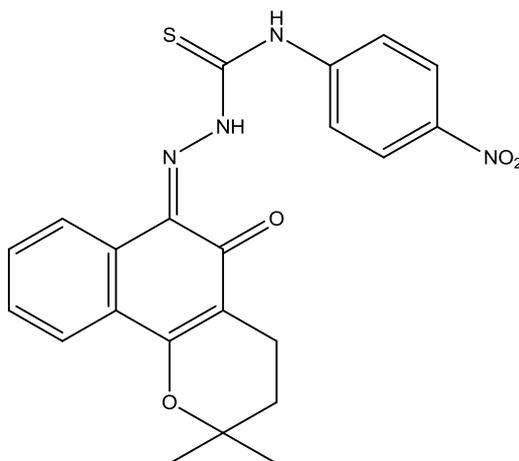
**4.2.5.4 Derivado 3d: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-etil-hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com 4-etil-tiossemicarbazida**
    - 4-etil-tiossemicarbazida: 120 mg / 1,2 eq./ 1 mmol
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 96%

- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com 4-etil-tiossemicarbazida**
    - 4-etil-tiossemicarbazida: 120 mg / 1,2 eq./ 1 mmol
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 95%
    - Tempo reacional: 30 minutos
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 343,44 g/mol
  - **PF:** 222-223°C
  - **Rf:** 0,47 (Hexano/Acetato de etila 9:1)
  - **IVTF (v cm<sup>-1</sup> ATR):** 3322,32 (NH), 2975,88 (C-H, Aromático), 2926,56 (C-H, Alifático), 1730,82 (C=O), 1592,85 (C=C), 1560,27 (C=N), 1528,91 (C=S), 1420,23 (N-C=S), 1111,36 (C-O-C, Assimétrica), 1040,38 (C=S).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):** δ 181,07 (C=S), 178,48 (C=O), 161,43 (C), 131,34 (C=N), 129,68 (CH-Ar), 129,09 (C-Ar), 128,58 (CH-Ar), 127,11 (C-Ar), 123,51 (CH-Ar), 122,57 (CH-Ar), 111,54 (C-Ar), 78,45 (C), 39,58 (CH<sub>2</sub>), 31,66 (CH<sub>2</sub>), 26,77 (2 CH<sub>3</sub>), 16,03 (CH<sub>2</sub>), 14,21 (CH<sub>3</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,37 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,37 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,85 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,56 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,82 (dq, 2H, *J* = 7,3 Hz, 5,5 Hz, 2 CH-Ar), 7,45 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,96 (m, 2H, 2 CH-Ar).
  
  - **Solubilidade**
    - Solúvel: Acetona, Acetato de etila, Clorofórmio, Diclorometano, DMSO, Metanol
    - Parcialmente solúvel: Etanol
    - Insolúvel: Água, Hexano

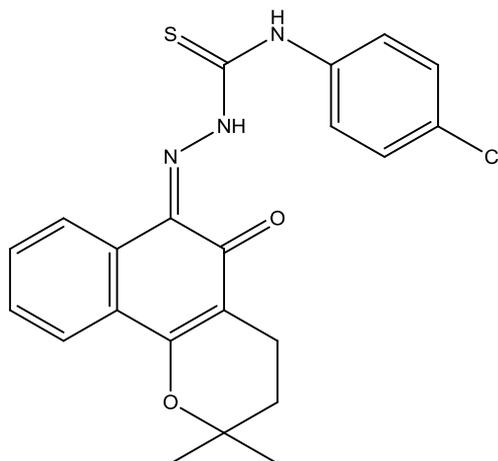
**4.2.5.5 Derivado 3e: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-nitrofenila**
    - Isotiocianato de 4-nitrofenila: 335,13 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 85%
    - Tempo reacional: 10 minutos
  
- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-nitrofenila**
    - Isotiocianato de 4-nitrofenila: 335,13 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 94 %
    - Tempo reacional: 24 horas
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 436,1711 g/mol
  - **PF:** 218 °C
  - **Rf:** 0,4 (Hexano/Acetato de etila 9:1)
  - **IVTF (v cm<sup>-1</sup> ATR):** 3274,17 (NH-Ar), 3076,11 (NH, amina secundária), 2974,31 (C-H, Aromático), 2943,90 (C-H, Alifático), 1636,52 (NO<sub>2</sub>), 1595,49

- (C=C), 1560,63 (C=N), 1507,34 (C=S), 1424,93 (N-C=S), 1400,27 (NO<sub>2</sub>), 1146,83 (C-O-C, Assimétrica), 1102,66 (C-O-C, Simétrica), 1035,40 (C=S).
- **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):** δ 188,24 (C=S), 175,77 (C=O), 163,25 (C), 143,9 (C-Ar), 142,76 (C-NO<sub>2</sub>), 131,21 (C=N), 129,6 (C-Ar), 128,38 (CH-Ar), 126,98 (CH-Ar), 125,08 (CH-Ar), 123,97 (CH-Ar), 122,75 (CH-Ar), 120,44 (CH-Ar) 113,41 (C), 79,02 (C), 32,16 (CH<sub>2</sub>), 26,74 (2 CH<sub>3</sub>), 14,05 (CH<sub>2</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,40 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,99 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,89 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 7,10 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,67 (m, 2H, 2 CH-Ar), 8,04 (m, 2H, CH-Ar), 8,25 (m, 2H, CH-Ar), 9,67 (m, 1H, NH-Ar).
  - **Solubilidade**
    - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>
    - Parcialmente solúvel: Etanol
    - Insolúvel: Água, Hexano

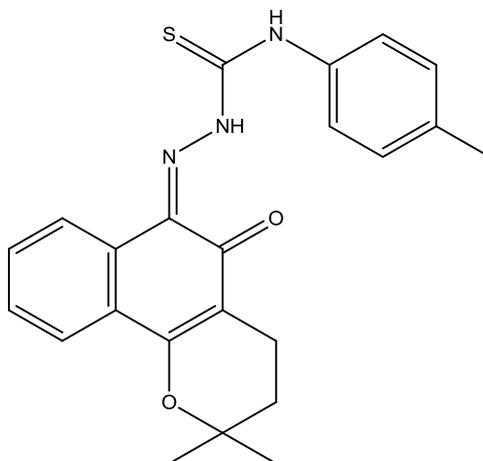
**4.2.5.6 Derivado 3f: (Z)-N-(4-clorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-clorofenila**
    - Isotiocianato de 4-cloro-fenila: 315,51 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo

- Rendimento: 98 %
  - Tempo reacional: 2 minutos
  
- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-clorofenila**
    - Isotiocianato de 4-cloro-fenila: 315,51 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 78 %
    - Tempo reacional: 4 horas
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 426,09 g/mol
  - **PF:** 228 °C
  - **Rf:** 0,5 (Hexano/Acetato de etila 9:1)
  - **IVTF ( $\nu$  cm<sup>-1</sup> ATR):** 3299,98 (NH-Ar), 2979,22 (C-H, Aromático), 2922,90 (C-H, Alifático), 1594,36 (C=C), 1561,04 (C=N), 1414,78 (N-C=S), 1112,16 (C-O-C, Assimétrica), 1101,14 (C-O-C, Simétrica), 1038,91 (C=S).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  181,25 (C=S), 176,4 (C=O), 161,86 (-C=O), 136,28 (NH-C=), 131,44 (-C=N), 131,05 (C-Ar), 129,94 (CH-Ar), 129,47 (C-Cl), 129,04 (CH-Ar), 128,99 (CH/C), 127,4 (C-Ar), 124,88 (CH-Ar), 123,77 (CH-Ar), 122,71 (C), 111,63 (C), 78,76 (O-C-), 31,68 (CH<sub>2</sub>), 26,81 (2 CH<sub>3</sub>), 16,08 (CH<sub>2</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 1, 40 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,80 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2,53 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz, CH<sub>2</sub>), 7,19 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,42 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,67 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,84 (m, 1H, CH-Ar), 8,03 (m, 1H, CH-Ar) 9,61 (s, 1H, NH-Ar), 15,24 (s, 1H, NH hidrazínico).
  - **Solubilidade**
    - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>
    - Parcialmente solúvel: Etanol
    - Insolúvel: Água, Hexano

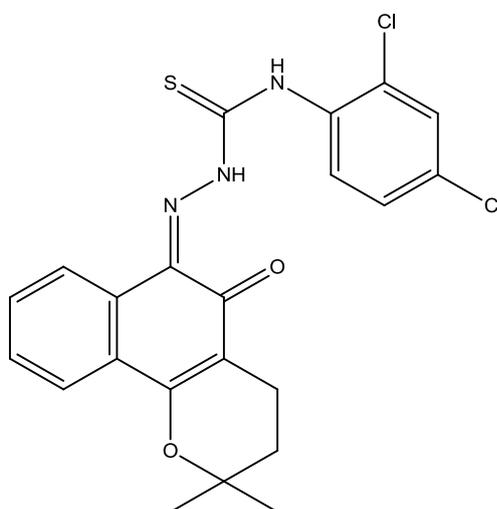
**4.2.5.7 Derivado 3g: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(p-toluil)hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-toluila**
    - Isotiocianato de 4-toluila: 272,53 mg/ 0,25 mL/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo-esverdeado
    - Rendimento bruto: 10 %
    - Tempo reacional: 30 minutos
  
- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 4-toluila**
    - Isotiocianato de 4-toluila: 272,53 mg/ 0,25 mL/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento bruto: 98 %
    - Tempo reacional: 2 horas
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 406,1496 g/mol
  - **PF:** 220 °C
  - **Rf:** 0,5 (Hexano/Acetato de etila 9:1)

- **IVTF ( $\nu \text{ cm}^{-1}$  ATR):** 3300,83 (NH-Ar), 2980,51 (C-H, Aromático), 2920,97 (C-H, Alifático), 1594,22 (C=C), 1561,12 (C=N), 1519,20 (C=S), 1417,16 (N-C=S), 1111,55 (C-O-C, Assimétrica), 1102,14 (C-O-C, Simétrica), 1038,63 (C=S).
- **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  181,26 (C=S), 176,69 (C=O), 161,72 (=C-O), 136,36 (CH-Ar), 135,12 (CH-Ar), 131,28 (C=N), 129,90 (C-Ar), 129,25 (CH-Ar), 129,57 (CH-Ar), 128,90 (C-Ar), 127,36 (C-Ar), 123,99 (C-Ar), 123,72 (C-Ar), 111,68 (C), 78,67 (C), 31,76 (CH<sub>2</sub>), 26,86 (2 CH<sub>3</sub>), 21,18 (CH<sub>3</sub>-Ar), 16,13 (CH<sub>2</sub>).
- **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1,39 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 1,80 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,54 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 7,16 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,41 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,55 (m, 2H, 2 CH-Ar), 7,96 (m, 2H, 2 CH-Ar), 9,58 (s, 1H, NH-Ar), 15,20 (s, 1H, NH hidrazínico).
- **Solubilidade**
  - Solúvel: Metanol, Etanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>
  - Parcialmente solúvel: Etanol
  - Insolúvel: Água, Hexano

**4.2.5.8 Derivado 3h: (Z)-N-(2,4-diclorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida**



- Dados reacionais pelo método de irradiação por micro-ondas
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 2,4-diclorofenila**
    - Isotiocianato de 2,4-diclorofenila: 380 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo-esverdeado
    - Rendimento: 61 %
    - Tempo reacional: 2 minutos
  
- Dados reacionais pelo método convencional
  - **Reação com hidrato de hidrazina e isotiocianato de 2,4-diclorofenila**
    - Isotiocianato de 2,4-diclorofenila: 380 mg/ 3 eq./ 1,86 mmoles
    - Sólido amorfo amarelo
    - Rendimento: 83 %
    - Tempo reacional: 1 hora
  
- Dados físico-químicos e Espectroscópicos
  - **PM:** 460,0998 g/mol
  - **PF:** 223°C
  - **Rf:** 0,55 (Hexano/Acetato de etila 9,5:0,5)
  - **IVTF ( $\nu \text{ cm}^{-1}$  ATR):** 3254,68 (NH-Ar), 2978,48 (C-H, Aromático), 2933,53 (C-H, Alifático), 1596,47 (C=C), 1559,38 (C=N), 1528,49 (C=S), 1098,15 (C-O-C, Simétrica), 1044,70 (C=S).
  - **RMN<sup>13</sup>C (75,4 MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  181,31 (C=S), 175,37 (C=O), 162,06 (C), 133,57 (C-Ar), 131,11 (C=N), 130,52 (C-Ar), 130,13 (CH-Ar), 129,11 (CH-Ar), 129,01 (CH-Ar), 127,44 (CH-Ar/C-Ar), 126,08 (CH-Ar), 123,82 (CH-Ar), 122,93 (CH-Ar), 111,58 (C), 78,71 (C), 31,7 (CH<sub>2</sub>), 26,81 (2 CH<sub>3</sub>), 16,07 (CH<sub>2</sub>).
  - **RMN<sup>1</sup>H (300MHz, ppm, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1,48 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>), 2,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,18 (m, 1H, CH-Ar), 7,25 (m, 1H, CH-Ar), 7,83 (m, 2H, 2 CH-Ar), 8,17 (m, 2H, CH-Ar), 8,89 (m, 1H, CH-Ar), 10,35 (s, 1H, NH-Ar), 15,25 (s, 1H, NH hidrazínico).
  - **Solubilidade**
    - Solúvel: Metanol, Acetato de etila, Metanol, DMSO, CHCl<sub>3</sub>

- Parcialmente solúvel: Etanol
- Insolúvel: Água, Hexano

### **4.3 Avaliações Biológicas**

Nesta seção estão descritas os procedimentos realizados para as avaliações *in vitro* da  $\beta$ -lapona e dos oito derivados frente a vermes adultos do *Schistosoma mansoni* e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM).

#### **4.1.1 Avaliação esquistossomicida *in vitro***

Os estudos realizados foram aprovados, previamente, pelo Comitê de Ética de Experimentos Animais, sob protocolo nº 23076.020127/2010-47 (Anexo 9.10).

A metodologia e os resultados dos testes *in vitro*, envolvendo a  $\beta$ -lapachona foram publicados na *Experimental Parasitology* (142 (2014) 83–90) (Anexo 9.11). O protocolo experimental foi empregado para o ensaio dos compostos sintetizados.

##### **4.1.1.1 Metodologia Geral para avaliação esquistossomicida *in vitro* da $\beta$ -lapachona e seus derivados**

Para os estudos, foram utilizados camundongos do tipo Swiss, obtidos e mantidos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami sob ambiente controlado (temperatura  $20 \pm 2$  °C, ciclo dia-luz de 12 horas), com livre acesso a comida (Labina<sup>®</sup> / Purina, São Paulo-SP) e água. Vinte camundongos machos, com 30 dias de idade e peso variando entre 26 e 30 g, foram infectados de forma percutânea por 120 cercárias do *Schistosoma mansoni* (Cepa BH), obtidas do Departamento de Medicina Tropical da UFPE e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA – UFPE).

As cercárias foram coletadas a partir de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria* sp. (hospedeiro intermediário), que quando expostos a luz, as liberam na água, onde foram recolhidas e utilizadas, logo em seguida, para a infecção dos camundongos.

#### **4.1.1.1.1 Coleta dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni***

Os camundongos, após 60 dias da infecção, foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes foram recolhidos por perfusão das veias mesentéricas e do sistema porta com solução salina estéril (0,9 % NaCl p/v).

Os vermes coletados foram transferidos para o meio RPMI 1640 suplementado com 20 mM de tampão HEPES, com os antibióticos penicilina e estreptomicina, ambos na concentração de 100 µg/mL e soro fetal bovino a 10%. Os vermes foram lavados duas vezes com este meio e foram mantidos nele até a realização do teste.

Após a verificação da viabilidade dos vermes através da observação em microscópio invertido, eles foram inseridos na estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 horas.

#### **4.1.1.1.2 Atividade esquistossomicida**

Os vermes viáveis após a permanência de 2 horas na estufa foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços contendo 2 mL do meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino, sendo inseridos 2 parasitos por poço (macho, fêmea e/ou casal). A placa foi incubada por mais 2 horas em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, os compostos foram adicionados nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM a partir de uma solução estoque do meio RPMI 1640 suplementado/ 1,5 % de DMSO. O praziquantel (10 µM) foi utilizado como controle positivo e o veículo como controle negativo.

#### **4.1.1.2 Critérios para a avaliação de motilidade e sobrevivência**

Após a adição do composto teste, os vermes foram avaliados em 24, 72 e 120 horas de incubação, através da observação em microscópio invertido e estereomicroscópio por, no mínimo, 2 minutos.

Para a análise da motilidade e sobrevivência foi utilizada uma escala de pontos onde 3 designa o verme com completos movimentos corporais; 2, com movimento parcial; 1, com movimentos nas extremidades ou imóvel, porém ainda vivo; e 0, sem movimento, morto.

### 4.3.1 Avaliação antibacteriana *in vitro*

Os compostos sintetizados foram avaliados frente à *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), com o objetivo de determinar a concentração mínima inibitória (CMI) de cada substância. Os testes foram realizados através do método de diluição em ágar com algumas modificações (CLSI, 2012).

#### 4.3.1.1 Micro-organismo

Para os estudos, foram utilizados dez cepas de *Staphylococcus aureus* obtidas e mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM) do Departamento de Antibióticos, UFPE (Tabela 3).

Todas as culturas empregadas são de origem clínica e apresentam resistência a diversos medicamentos antibacterianos como macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, lincosamidas, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e cloranfenicol. As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33591 foram utilizadas como padrão negativo e positivo da resistência a meticilina, respectivamente.

**Tabela 3 – Micro-organismos multirresistentes avaliados.**

<i>Staphylococcus aureus</i>	Fenótipo de Resistência <sup>1</sup>
ATCC 25923	Controle SASM
ATCC 33591	Controle SARM
LFBM 05	AZI, CFO, PEN
LFBM 16	AZI, CIP, CFO
LFBM 26	AZI, CFO, PEN
LFBM 28	AMC, CFO, CIP
LFBM 29	AMC, CIP, CFO, GET
LFBM 30	AMC, CFO, PEN
LFBM 31	AMC, CFO, CIP
LFBM 33	AZI, CFO; CIP;

**ATCC:** American Type Culture Collection; **LFBM:** Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; **SASM:** *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina; **SARM:** *Staphylococcus aureus* Resistente à meticilina; **AMC:** Amoxicilina/ácido clavulânico; **AZI:** azitromicina; **CFO:** cefoxitina; **CIP:** ciprofloxacino; **GET:** gentamicina; **PEN:** penicilina. <sup>1</sup>Fenótipo de Resistência determinado pelo método de difusão em disco.

#### 4.3.1.2 Preparação do Inóculo

Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em meio Ágar Mueller-Hinton (AMH) e, posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. De cada cultura, colônias morfológicamente similares foram selecionadas e inoculadas, com alça de platina, em Caldo Mueller-Hinton (CMH). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turbidez foi comparada ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que equivale a aproximadamente de  $10^8$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Em seguida, o inóculo foi diluído até obter a concentração final de  $10^7$  UFC/mL.

#### 4.3.1.3 Preparação do Meio com os compostos sintetizados

De cada um dos nove compostos sintetizados, 12,8 mg foram pesados e emulsionados em sistema composto por etanol absoluto/tween 80/água aquecida (2:1: 7), obtendo-se 10 mL de uma solução estoque com concentração de 1280 µg/mL. Em seguida, diluições geométricas de razão dois foram realizadas, obtendo-se uma série de diluições cuja concentração variou de 1280 µg/mL a 40 µg/mL (Figura 14).

Estas soluções foram esterilizadas em autoclave a 121 °C, 1 atmosfera, durante 15 minutos. A β-lapachona foi esterilizada por filtração utilizando membrana Millipore® de porosidade 0.22µm. Para assegurar a estabilidade dos compostos, foi realizada cromatografia em camada delgada.

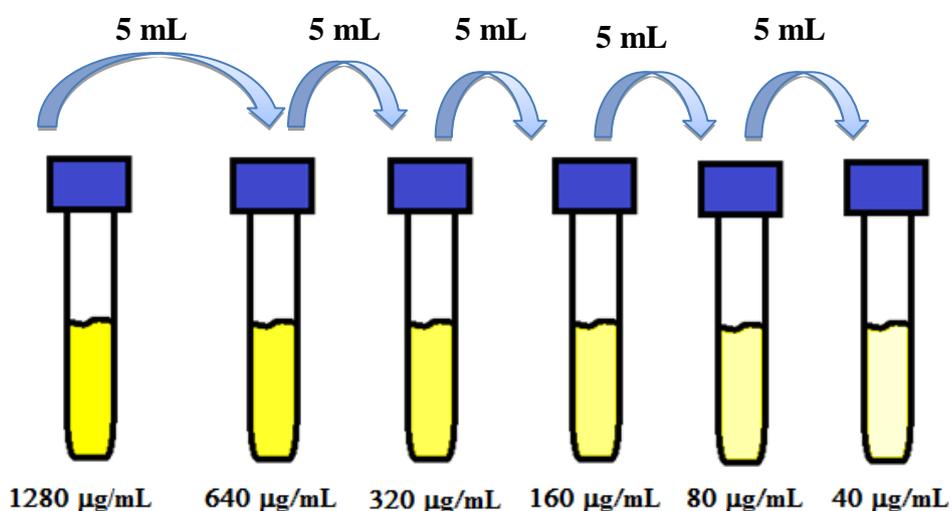
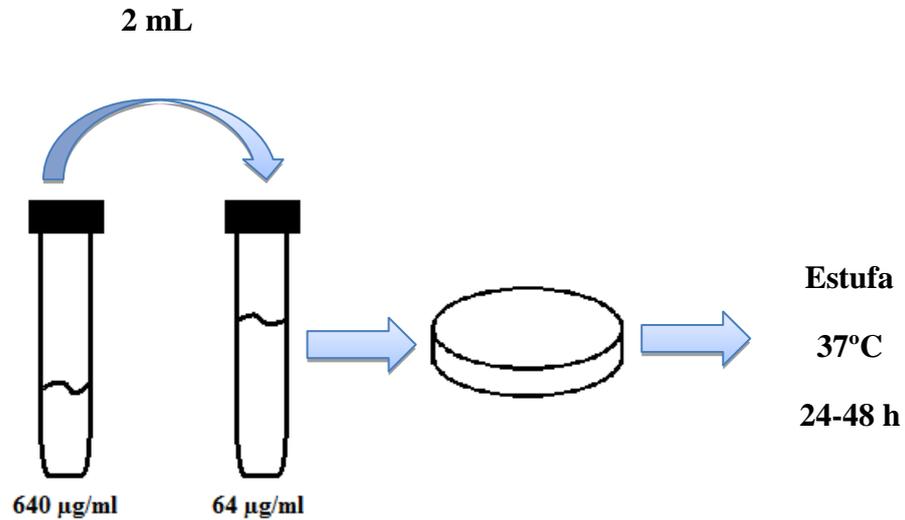


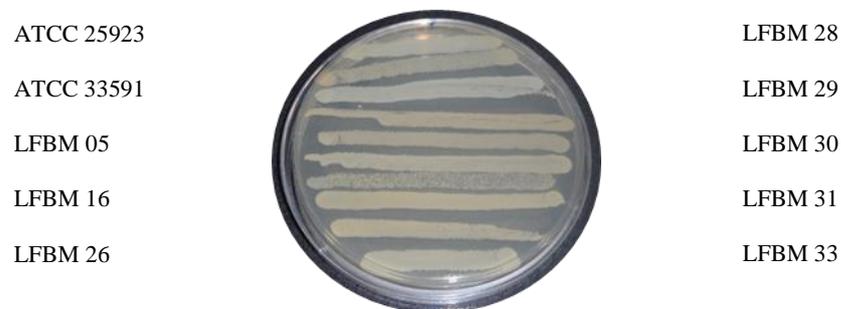
Figura 14 – Série de diluições geométricas para a preparação dos compostos sintetizados

A última etapa consistiu na diluição e incorporação dos compostos ao meio. De cada diluição, foram retirados 2 mL e inseridos no tubo com 18 mL de meio, perfazendo um volume total de 20 mL (Figura 15). Desta forma, foram obtidos, para cada composto sintetizado, concentrações que variam de 128 µg/mL e 4 µg/mL. Todas as placas foram incubadas em estufa a 37 °C de 24, para assegurar a sua esterilidade.



**Figura 15 – Diluição e incorporação dos derivados ao meio de cultura.**

Para o semeio das placas contendo os compostos sintetizados, foi utilizada uma alça se platina calibrada em 0,1 mL e este foi realizado em estrias. Desta forma, todas as placas receberam as dez cepas de *S. aureus* (Figura 16).



**Figura 16 – Semeio dos micro-organismos em forma de estria.**

#### **4.3.1.4 Atividade antimicrobiana**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração dos compostos sintetizados capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos avaliados. O crescimento de apenas uma colônia decorrente do inóculo foi desconsiderado (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

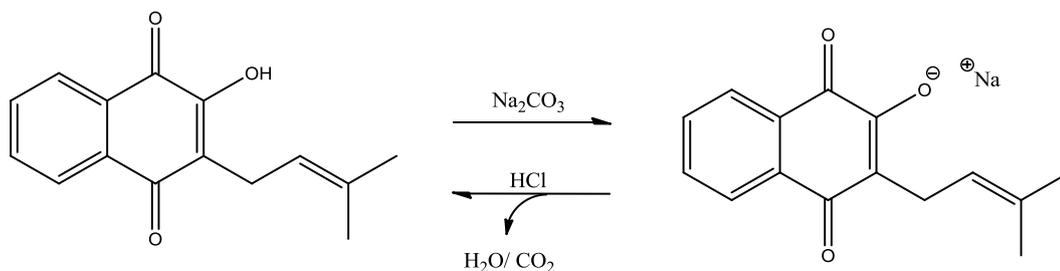
## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1. SÍNTESE

A estratégia sintética para a obtenção de novas tiossemicarbazonas derivadas de 1,2-naftoquinona foi iniciada com a extração do lapachol e, posterior, síntese da  $\beta$ -lapachona.

### 5.1.1. Lapachol

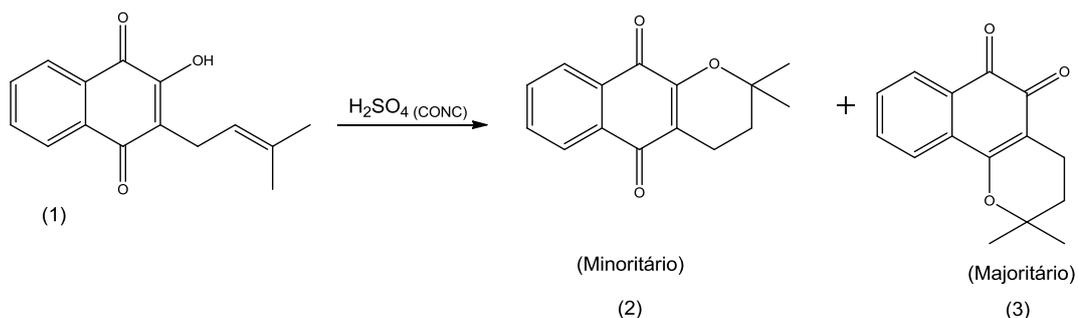
O lapachol foi extraído a partir de metodologia descrita na literatura que envolve uma reação ácido-base. O lapachol em solução aquosa apresenta-se insolúvel. Em presença de bicarbonato de sódio, ele perde um próton formando o sal correspondente solúvel em água, podendo ser separado da serragem por filtração. A solução vermelha resultante é acidificada com HCl, então, o sal presente na solução é protonado e o lapachol que é insolúvel em água precipita na forma de cristais amarelos, e é levado a superfície pelas bolhas formadas pelo  $\text{CO}_2$ , onde é coletado (Esquema 17) (FERREIRA, 1996).



**Esquema 17 – Reação ácido-base envolvida no processo de extração do lapachol.**

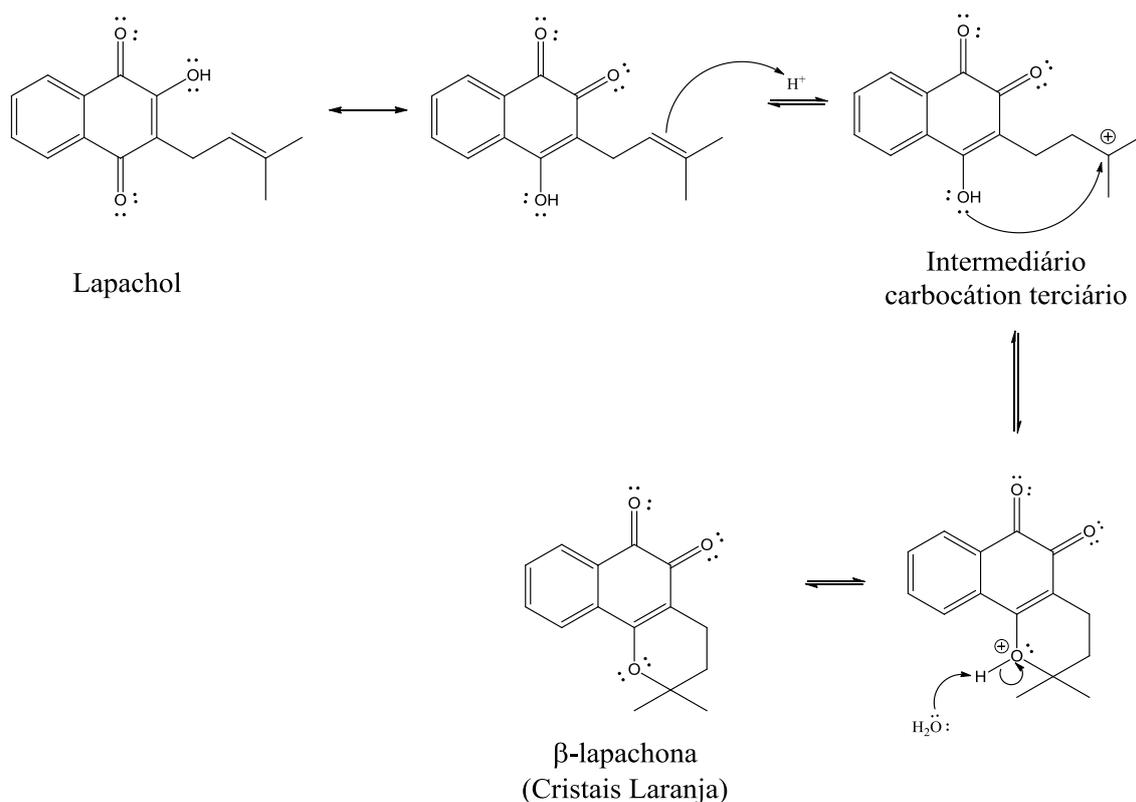
### 5.1.2. $\beta$ -lapachona

A  $\beta$ -lapachona foi obtida através de metodologia estudada por Hooker e Paternó (ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002; HOOKER, 1936, 1893, 1896; OSSOWSKI et al., 2008; THOMSON, 1991), que consiste na reação do lapachol (1) com ácido sulfúrico concentrado, obtendo-se uma mistura da  $\beta$ -lapachona (3) e  $\alpha$ -lapachona (2).



### Esquema 18 – Obtenção da $\beta$ -lapachona a partir do lapachol.

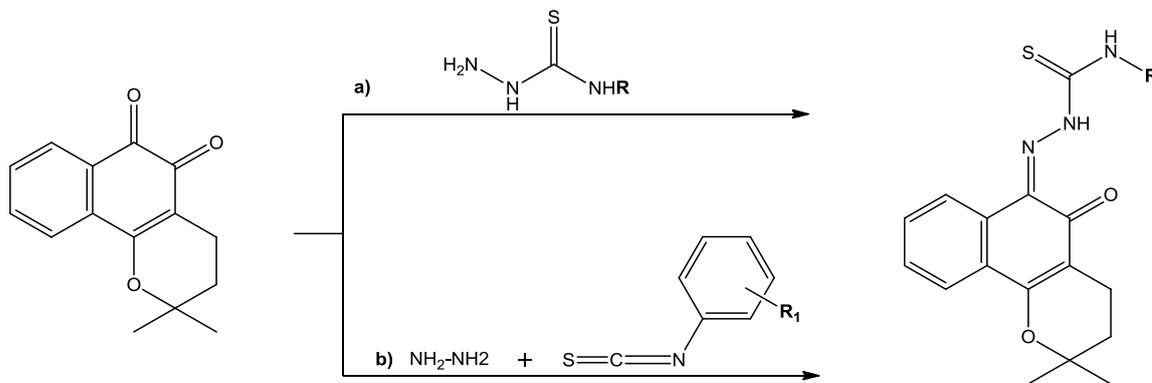
Utilizando a metodologia empregada por Hooker e Paternò, a síntese da  $\beta$ -lapachona foi iniciada pela reação de oxidação do lapachol com o ácido sulfúrico concentrado em banho de gelo. O mecanismo começa com a captura de um próton pelos elétrons  $\pi$  da cadeia lateral isoprenila do lapachol, formando um intermediário carbocátion terciário. A etapa seguinte consiste na ciclização do anel heterocíclico através do ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila ao carbocátion terciário. Por fim, com a adição de água há a neutralização do meio e a obtenção da  $\beta$ -lapachona (Esquema 19). (CUNHA-FILHO et al., 2006; ETTLINGER, 1947).



### Esquema 19 - Mecanismo para obtenção da $\beta$ -lapachona a partir do Lapachol.

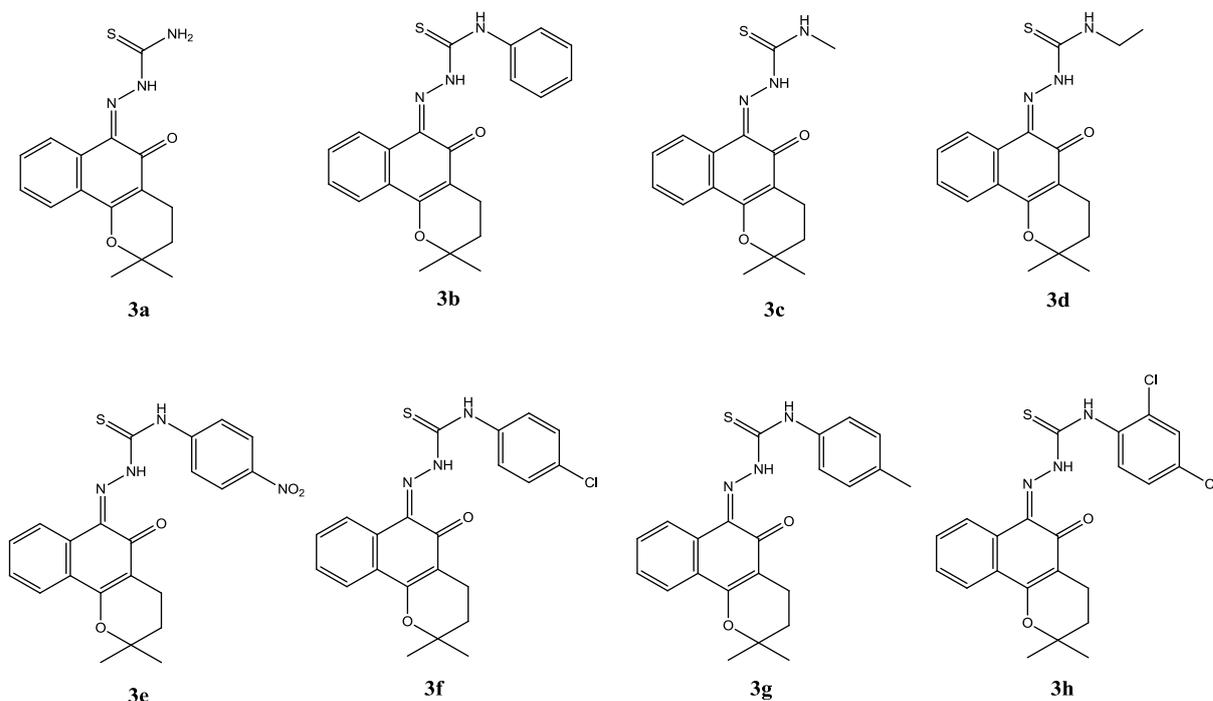
### 5.1.3. Síntese das Tiossemicarbazonas derivadas da $\beta$ -lapachona (**3a-3h**)

O esquema 20 apresenta a rota sintética utilizada para a obtenção dos derivados. Para a síntese dos derivados **3a-3h** (Figura 17) foram utilizadas duas rotas distintas. A rota “a” consistiu na reação da  $\beta$ -lapachona com as diversas tiossemicarbazidas e a rota “b” na reação *one-pot* de três componentes da  $\beta$ -lapachona com os diversos isotiocianatos e a hidrazina, que *in situ* geraram as tiossemicarbazidas correspondentes (Esquema 20).



**Esquema 20 – Rota sintética empregada para a síntese dos derivados 3a-3h.**

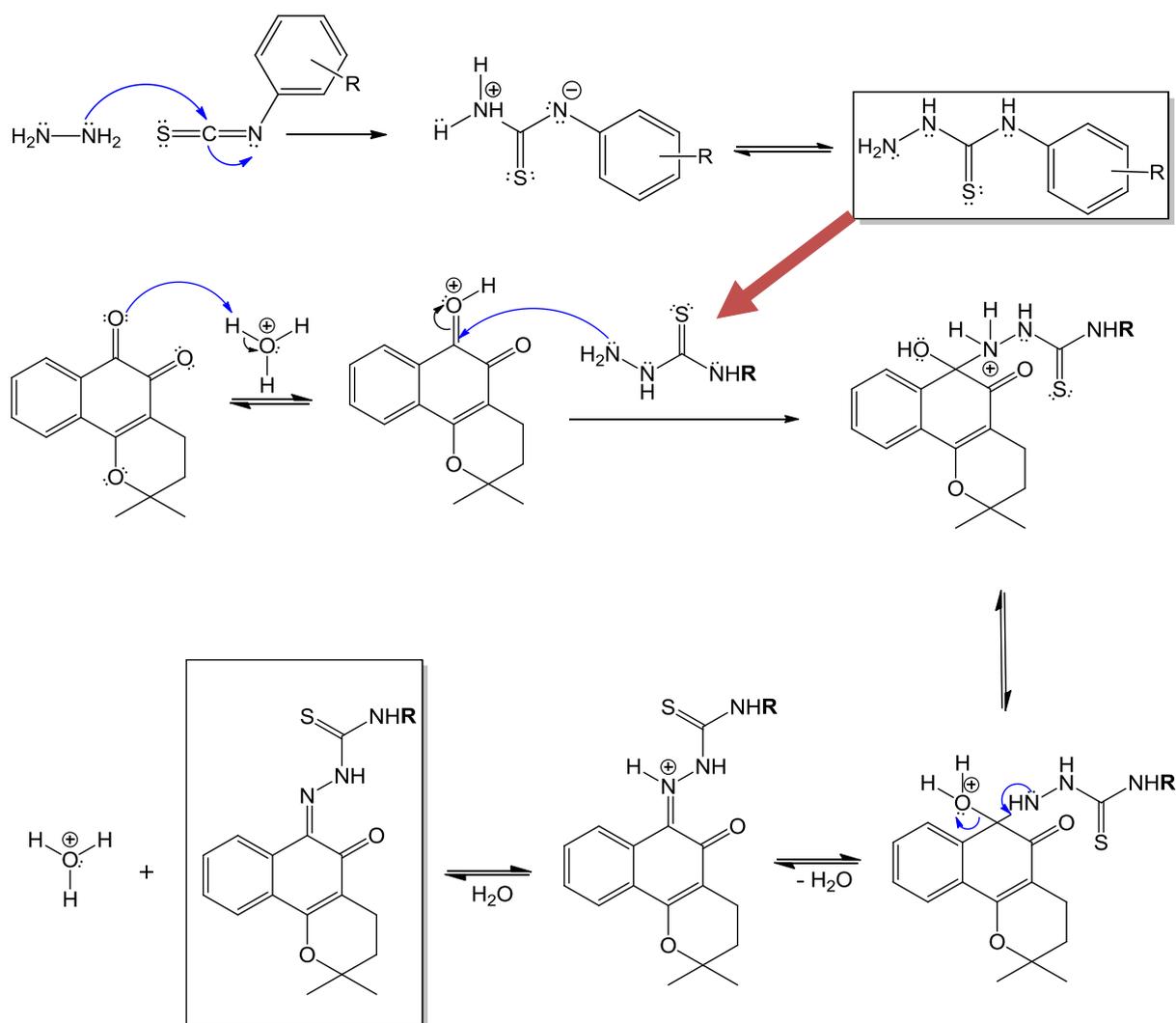
A figura 21 mostra as estruturas moleculares das oito novas tiossemicarbazidas derivadas da  $\beta$ -lapachona (**3a-3h**).



**Figura 17 – Estrutura das novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona (**3a-3h**).**

### 5.1.3.1. Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 3a-3h

. As reações em que foram utilizadas a hidrazina e a isotiocianato possuem mais uma etapa que consiste na obtenção da tiossemicarbazida correspondente ao isotiocianato utilizado. Esta etapa é semelhante à adição de aminas à carbonila. O mecanismo inicia com o ataque nucleofílico da hidrazina no carbono do isotiocianato, seguida da deslocalização da dupla ligação, C=N, para o nitrogênio do isotiocianato gerando o intermediário dipolar. Este é neutralizado formando ao final a tiossemicarbazida correspondente (Esquema 21).



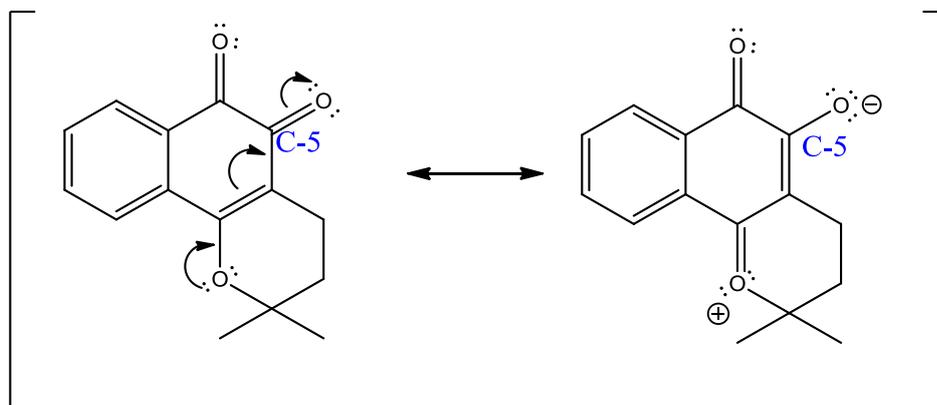
**Esquema 21 – Mecanismo reacional de síntese dos derivados 3a-3h.**

**R** = H (3a); fenil (3b); metil (3c); etil (3d).

**R<sub>1</sub>** = *p*-nitro (3e); *p*-Cl (3f); *p*-CH<sub>3</sub> (3g); 2,4-Cl (3h).

A partir da tiossemicarbazida, o mecanismo ocorre da mesma forma para todos os derivados até a obtenção dos compostos desejados. A reação começa com a protonação do oxigênio da carbonila “C-6” da  $\beta$ -lapachona dando origem ao íon oxônio. Segue-se com o ataque nucleofílico do nitrogênio hidrazínico da tiossemicarbazida ao carbono “C-6” formando um intermediário hemiaminal N-protonado. Então, há a transferência do próton do nitrogênio protonado para o oxigênio, seguida da perda de água (desidratação) e, posterior neutralização e formação da função imina (Esquema 21). A velocidade da reação é determinada pelo ataque nucleofílico do nitrogênio da tiossemicarbazida (AMARAL; BASTOS, 1971).

O ataque nucleofílico da tiossemicarbazida ocorre na carbonila C-6 porque o carbono desta é mais eletrofílico do que o da carbonila C-5. A maior eletrofilicidade do carbono C-6 pode ser explicada através da ressonância apresentada pela  $\beta$ -lapachona (Esquema 22), onde se uma carga positiva for gerada no carbono C-5 é estabilizada pelo sistema de ressonância que envolve o par de elétrons  $\pi$  da dupla ligação e o par de elétrons livre do oxigênio do heterociclo. Esta estabilização não ocorre se a carga positiva for gerada no carbono C-6, porque apesar dele estar próximo ao benzeno, este é muito estável e, dificilmente, irá destruir a sua aromaticidade para estabilizar o carbono em questão. Por isso, o carbono C-6 é mais eletrofílico que o carbono C-5. Esta observação corrobora com estudo de cristalografia de raio-x da  $\beta$ -lapachona realizado por Silva e colaboradores (2003), onde através da comparação de parâmetros geométricos foi demonstrado que a carga atômica do carbono C-6 (+0,484) é superior ao do C-5 (+0,472). Isto indica que C-6 possui uma maior eletrofilicidade e, por isso é mais reativo frente à nucleófilos que, no presente trabalho, foram as tiossemicarbazidas. (CHENNA et al., 2008; SILVA et al., 2003).

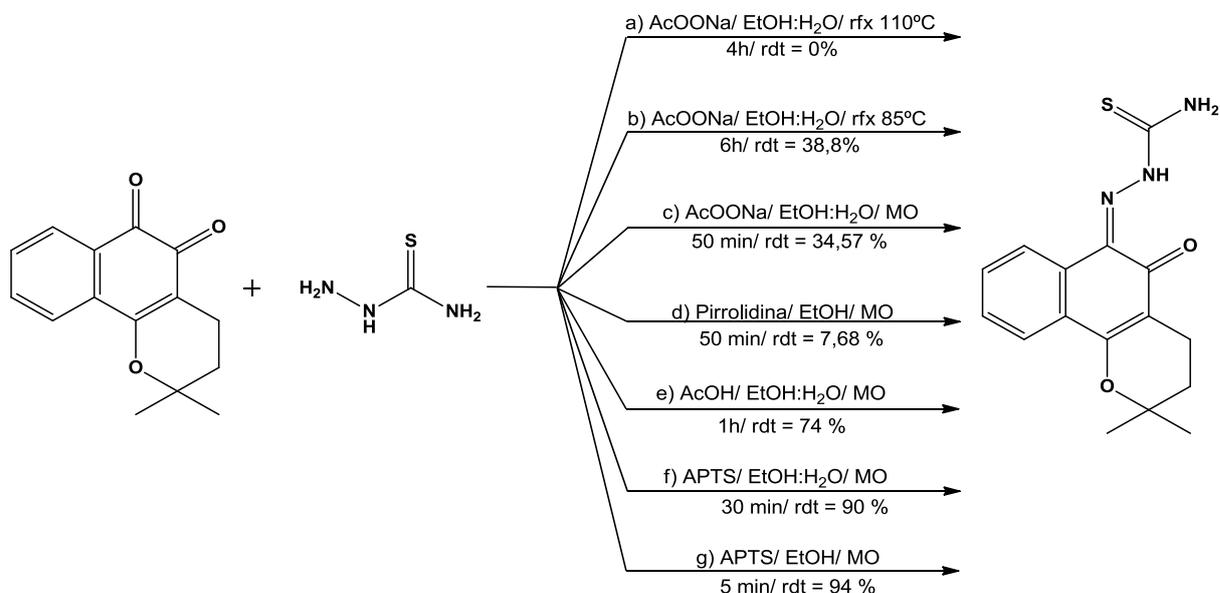


**Esquema 22 – Eletrofilicidade dos carbonos das carbonilas C-5 e C-6 em relação à ressonância da  $\beta$ -lapachona.**

### 5.1.3.2. Estudos de síntese do derivado 3a – (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida

Com o objetivo de sintetizar o derivado **3a**, foram realizadas diversas tentativas utilizando as metodologias convencional e por irradiação de micro-ondas que consistiram na reação da  $\beta$ -lapachona com a tiossemicarbazida.

Os parâmetros reacionais, como tempo e temperatura, variaram com as rotas, assim como o catalisador e o solvente. Na primeira rota realizamos um dos procedimentos descrito na literatura (“Processo para a preparação de derivados naftopirano substituídos,” 1985). Para os procedimentos seguintes foram efetuadas modificações nesta primeira metodologia com o intuito de otimizar o rendimento e o tempo reacional (Esquema 23).



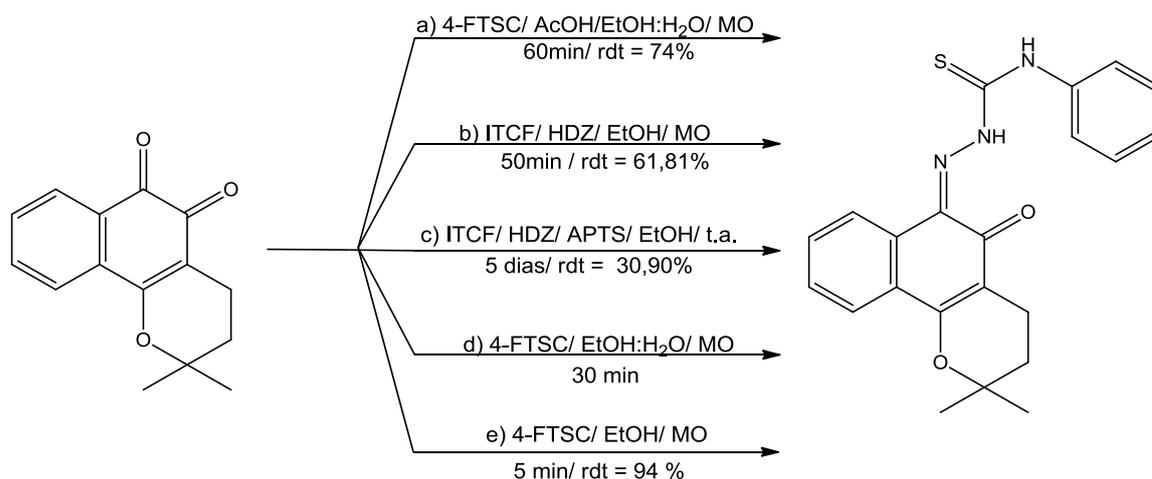
**Esquema 23 - Estudos de síntese do derivado 3a.**

Durante a realização dos procedimentos percebemos que a reação se processa de forma mais efetiva com catálise ácida, para isto basta comparar os rendimentos e tempos reacionais das rotas A, B, C e D, onde foi utilizada catálise básica, com as rotas E, F e G (catálise ácida). Na catálise básica percebemos a formação de muita degradação, rendimentos nulos ou abaixo de 40% e tempos reacionais próximos ou superiores à uma hora. Enquanto que nas reações catalisadas por ácido, o produto praticamente puro foi obtido após uma simples filtração e os rendimentos foram acima de 74% com tempo reacional igual ou inferior

a 1 hora. A rota G foi eleita como procedimento padrão para a obtenção de todos os derivados.

### 5.1.3.3 Estudos de síntese do derivado **3b** - (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida

Com a intenção de obter o derivado **3b** a partir da  $\beta$ -lapachona, foram realizados experimentos, partindo das experiências e conclusões obtidas nas tentativas de síntese do **3a**. Foram realizadas reações de obtenção direta, reagindo a 4-fenil-tiossemicarbazida com  $\beta$ -lapachona, e de obtenção indireta, utilizando a hidrazina e o isotiocianato de fenila para obter a 4-fenil-tiossemicarbazida *in situ*, que reagiu com a  $\beta$ -lapachona. (Esquema 24).



#### Esquema 24- Estudos de síntese do derivado **3b**.

Na primeira tentativa utilizamos a metodologia de obtenção direta reagindo a  $\beta$ -lapachona com a 4-fenil-tiossemicarbazida em meio etanol:água com catálise ácida (ácido acético glacial) no micro-ondas por 1 hora (rota A). Obtivemos o derivado **3b** com rendimento de 74%. Na segunda tentativa, trocamos a 4-fenil-tiossemicarbazida pela hidrazina e isotiocianato de fenila e após 50 minutos de irradiação, obtivemos o produto bastante impuro com rendimento de 62% (rota B). Como não encontramos uma combinação de parâmetros eficiente para obtenção do **3b** no micro-ondas e, sabendo que os isotiocianatos são bastantes reativos, a rota C foi realizada em temperatura ambiente. A reação foi mantida por 5 dias e obtivemos um rendimento de 31% (rota C).

Com os bons resultados obtidos com as rotas F e G para a obtenção do derivado **3a**. Repetimos as metodologias empregadas nestas rotas para o derivado **3b**. Na rota D, utilizamos

a 4-feniltiossemicarbazida, a mistura etanol:água como solvente, catálise ácida (APTS) e irradiamos por 30 minutos. Obtivemos o produto bastante impuro. A última tentativa condiz com a metodologia realizada na rota G para obtenção do composto **3a**, a qual foi designada como padrão para a obtenção dos demais derivados. Nesta reação foram utilizados a  $\beta$ -lapachona, a 4-fenil-tiossemicarbazina, em meio etanólico ácido (APTS). A mistura reacional foi irradiada por 5 minutos a 120° e o derivado **3b** foi obtido com rendimento puro de 94%, igual ao obtido para o **3a** (rota E).

Analisando todos os experimentos realizados, verificou-se que a 4-fenil-tiossemicarbazida se mostrou mais efetiva para a obtenção do **3b** por irradiação de micro-ondas quando comparada ao isotiocianato de fenila e hidrazina 80 %. O etanol associado ao ácido *p*-tolueno-sulfônico fez o meio onde a reação demonstrou melhor desempenho, tanto em tempo quanto em rendimento.

#### 5.1.3.3. Derivados **3c**, **3d**, **3e**, **3f**, **3g**, **3h**

Almejando a síntese dos produtos **3c-3h**, e ciente da semelhança reacionais destes produtos com os obtidos anteriormente, utilizamos como referência para essa metodologia, os experimentos precedentes, empregando as tiossemicarbazidas correspondentes para a síntese dos derivados **3c** e **3d**, e para os demais, **3e-3h**, os isotiocianatos correlativos.

Para todos os derivados (**3c-3h**), foram testadas as metodologias por irradiação por micro-ondas e a convencional, assim como realizado anteriormente com os compostos **3a** e **3b**. Os derivados **3c**, **3d** e **3f** obtiveram melhores resultados nas reações em micro-ondas, enquanto os derivados **3e**, **3g** e **3h** apresentaram melhores rendimentos pela metodologia convencional (Tabela 4).

Analisando os tempos reacionais e os isotiocianatos utilizados nas reações dos derivados **3e-3h** através da metodologia convencional, percebemos que os resultados obtidos corroboram com o estudo de Amaral e Bastos que determinaram que a velocidade da formação da tiossemicarbazona é definida pelo ataque nucleofílico do Nitrogênio (N-1) da tiossemicarbazida. O derivado **3e** que possui o grupo nitro, forte retirador de elétrons, ligado ao fenil, pode ter diminuído a nucleofilia do nitrogênio (N-1) e, por esse motivo, ter aumentado o tempo reacional. O contrário pode ter ocorrido com os derivados **3f**, **3g**, **3h** que

possuem grupos doadores de elétrons. Neste caso ao doar elétrons para o sistema, os grupos crescem a nucleofilia do nitrogênio da tiossemicarbazona, resultando num aumento da velocidade reacional e, conseqüente, redução do tempo reacional.

**Tabela 4 – Rendimentos e tempos reacionais dos derivados 3a-3h empregando as metodologias de irradiação por micro-ondas e convencional.**

Derivado	Micro-ondas		Convencional	
	Rendimento	Tempo reacional	Rendimento	Tempo reacional
<b>3<sup>a</sup></b>	94 %	5 minutos	39 %	6 horas
<b>3b</b>	91 %	5 minutos	31 %	5 dias
<b>3c</b>	77 %	95 minutos	51 %	5 horas
<b>3d</b>	96 %	5 minutos	95 %	30 minutos
<b>3e</b>	85 %	10 minutos	94 %	24 horas
<b>3f</b>	98 %	2 minutos	78 %	4 horas
<b>3g</b>	10 %	30 minutos	98 %	2 horas
<b>3h</b>	61 %	2 minutos	83%	1 hora

A relação observada, na metodologia convencional, entre os tempos reacionais e grupos substituintes não foi vista nas reações realizadas em reator de micro-ondas, como pode ser notada na tabela acima.

Em relação às reações em que foram utilizadas as tiossemicarbazidas (**3a-3d**), todas apresentaram tempo reacional de 5 minutos para o micro-ondas, exceto a 3c com tempo reacional de 95 minutos.

As reações às quais foram utilizadas a tiossemicarbazida (**3a-3d**) foram mais efetivas pela metodologia por irradiação de micro-ondas, obtendo rendimentos entre 76,8 – 96 % em menor espaço de tempo. Enquanto que as reações em que foram utilizados os isotiocianatos e

hidrazina, derivados **3e-3g**, apresentaram melhores resultados pela metodologia convencional, com rendimentos variando entre 78,3 – 98%.

#### 5.1.4. Caracterização espectrométrica da $\beta$ -lapachona e seus derivados 3a-3h

Nesta seção encontrara-se a discussão da caracterização espectrométrica da  $\beta$ -lapachona e dos oito derivados sintetizados.

##### 5.1.4.1. $\beta$ -lapachona;

Na análise no Infravermelho, foram observadas bandas de deformação axial de “C-H” aromático e alifático em  $2978,18\text{ cm}^{-1}$  e  $2934,7\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Absorções em  $1693,83\text{ cm}^{-1}$  e  $1589,05\text{ cm}^{-1}$  são condicentes com deformação axial “C=O” e estiramento da ligação “C=C” em aromáticos. As bandas encontradas em  $1311,48\text{ cm}^{-1}$  e  $1114,51\text{ cm}^{-1}$  correspondem respectivamente às deformações axiais assimétricas e simétricas da ligação C-O-C.

A RMN<sup>1</sup>H da  $\beta$ lapachona condiz com os dados encontrados na literatura (ALVES et al., 2008) Os Hidrogênios Aromáticos apresentam-se como dois dubletos em 7,84 ppm (1H) e 7,685 ppm (2H) e um triplo dubleto em 7,54 ppm (1H). O hidrogênio do *td* apresenta acoplamento  $J^3$  tanto com o *d* 7,685 ppm ( $J= 4,44\text{ Hz}$ ), como com o *d* 7,84 ( $J= 7,77\text{ Hz}$ ). Dois tripletos em 1,765 ppm (2H) e 2,34 ppm (2H) foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 7, que acoplam entre si com  $J^3= 6,53\text{ Hz}$ . Os hidrogênios referentes às metilas aparecem como um único singleto em 1,38 ppm.

O espectro de RMN<sup>13</sup>C exibe sinais característicos de carbonilas em 179,034 ppm 177,790 ppm. Estes carbonos se localizam nas frequências mais altas porque estão diretamente ligados ao O, que por se muito eletronegativo, desloca a densidade eletrônica para si, deixando o C mais desblindado (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Os carbonos aromáticos apresentam-se em  $\delta$  134,980 (CH-Ar), 132,065 (C-Ar), 130,805 (CH-Ar), 129,905 (C-Ar), 127,791 (CH-Ar), 123,663 (CH-Ar). As metilas aparecem em um único sinal em 26,298 ppm, os carbonos quaternários alifáticos estão em 112,476 ppm, 79,044 ppm, e dois carbonos secundários apresentaram deslocamento de 30,778 ppm, 15,935 ppm.

### 5.1.4.2. Derivados 3a-3h

Nesta seção encontrara-se a discussão da caracterização espectrométrica dos oito derivados sintetizados (**3a-3h**)

#### 5.1.4.2.1. Espectros de Infravermelho

Os derivados apresentaram as principais bandas de absorção em regiões similares, que confirmam a manutenção do esqueleto da  $\beta$ -lapachona (Tabela 5) e a inserção das tiossemicarbazidas (Tabela 6).

**Tabela 5 – Bandas de absorção referentes à manutenção do esqueleto da  $\beta$ -lapachona.**

Compostos	Bandas de Absorção (cm <sup>-1</sup> )					
	CH-Ar	CH-Alif.	C=O	C=C	C-O-C (Assim.)	C-O-C (Simétrica)
$\beta$ -lapachona	2978,18	2934,07	1693,83	1589,83	1114,51	1092,20
<b>3a</b>	2974,66	2931,78	-	1593,28	1113,03	1100,22
<b>3b</b>	2983,11	2923,25	-	1593,83	1126,75	1099,48
<b>3c</b>	2985,71	2927,24	1613,62	1594	1112,26	1100,64
<b>3d</b>	2975,88	2926,56	1612,61	1592,85	1310,98	1111,36
<b>3e</b>	2974,31	2943,90	-	1595,49	1146,83	1102,66
<b>3f</b>	2979,22	2922,90	-	1594,36	1112,16	1101,14
<b>3g</b>	2980,51	2920,97	-	1594,22	1111,55	1102,14
<b>3h</b>	2978,48	2933,53	-	1596,47	1098,15	1044,70

A manutenção da estrutura aromática é confirmada pela presença da banda na região 1590 cm<sup>-1</sup> referente à ligação “C=C” aromática. A porção heterocíclica é observada na presença de bandas de deformação assimétrica e simétrica de “C-O-C” nas regiões de 1300 cm<sup>-1</sup> e 1100 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. As bandas que condizem à

deformação do CH-Aromático e CH-Alifático são encontradas na região entre 2990-3000  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise do infravermelho confirma a substituição da carbonila e consequente formação da imina, pela diminuição da intensidade da banda referente à carbonila (Tabela 8) e o aparecimento das bandas em 1560  $\text{cm}^{-1}$ , 1400  $\text{cm}^{-1}$  e 1044  $\text{cm}^{-1}$ , que condizem com as ligações “C=N”, “N-C=S” e “C=S”, respectivamente. A presença em todos os derivados das bandas correspondentes as ligações “C=S” e “N-C=S” é evidência de que os compostos apresentam-se preferencialmente na conformação tiona. A banda referente à amina terminal (NHR) da tiossemicarbazona é evidenciada na região entre 3200-3400  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 8).

**Tabela 6 – Bandas de absorção referentes à inserção da porção tiossemicarbazona.**

Composto	Bandas de Absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	NH-Ar	NH- Hdz	C=N	N-C=S	C=S
<b>3a</b>	3414,38	3232,28	1559,17	1418,68	1033,44
<b>3b</b>	3302,15	3050,16	1560,36	1410,23	1037,98
<b>3c</b>	3329,21	-	1560,52	1441,53	1039,59
<b>3d</b>	3322,32	-	1560,27	1420,23	1040,38
<b>3e</b>	3274,17	-	1560,63	1424,93	1035,40
<b>3f</b>	3299,98	-	1561,04	1414,78	1038,91
<b>3g</b>	3300,83	-	1561,12	1417,16	1038,63
<b>3h</b>	3254,68	-	1559,38	-	1044, 70

### 5.1.4.2.2. RMN<sup>13</sup>C

A substituição á carbonila C-6 é observada pelo desaparecimento de carbono relativo à carbonilas, em contrapartida com o aparecimento do carbono da tiona, acima de 180 ppm, e da imina, na região de 131 ppm (Figura 18).

Os carbonos referentes aos “CH-Ar” são encontrados entre 120-130 ppm, os carbonos CH<sub>2</sub> aparecem como dois sinais, um entre 15-16 ppm (C-12) mais blindado pela proximidade a duas metilas, e outro entre 30-40 ppm (C-11), mais desblindado por estar próximo à dupla ligação (Figura 19).

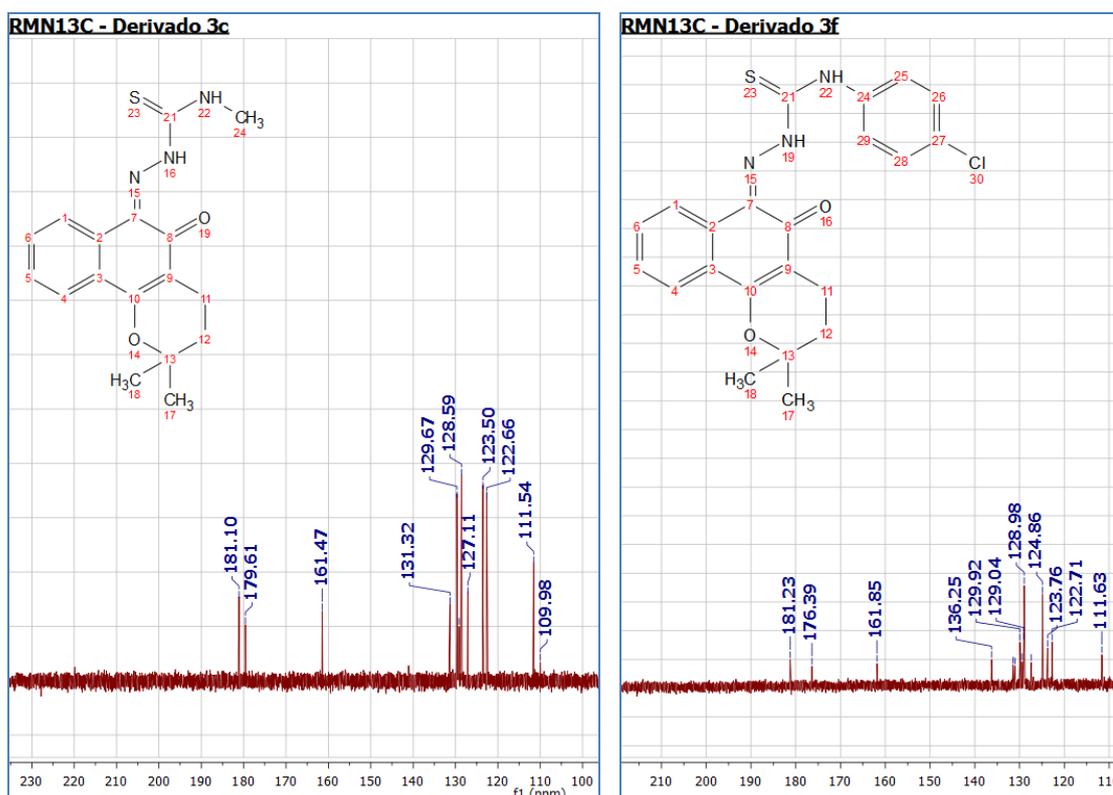


Figura 18 – RMN<sup>13</sup> demonstrando os carbonos referentes à tiona e à imina.

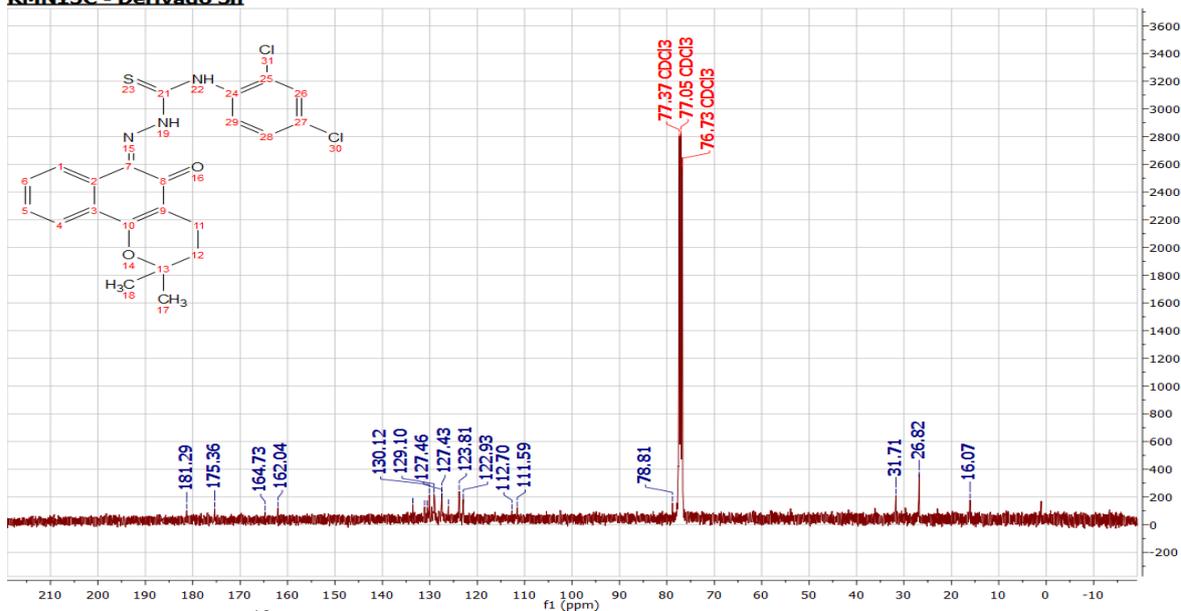
RMN<sup>13</sup>C - Derivado 3h

Figura 19 – RMN<sup>13</sup>C apresentando o deslocamento dos carbonos “CH<sub>2</sub>”

As metilas aparecem como pico único na região de 26 ppm. Os compostos 3c e 3d apresentam mais um sinal de metila em 31 ppm e 14 ppm, respectivamente (Figura 20).

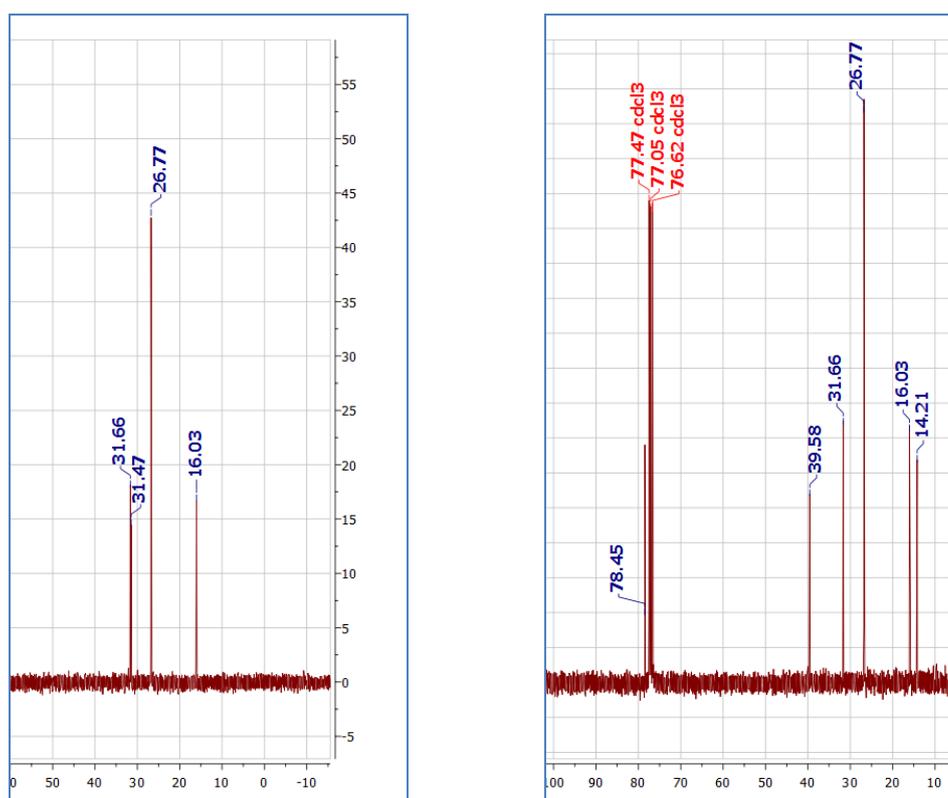


Figura 20 – RMN<sup>13</sup>C apresentando os deslocamentos das metilas dos compostos 3c (esquerda) e 3d (direita).

### 5.1.4.2.3 RMN<sup>1</sup>H

Os hidrogênios referentes às duas metilas aparecem como um único singlete em 1,38-1,40 ppm, exceto para o composto **3d** que apresenta este singlete integrando para 9 hidrogênios devido à presença do grupo etil na tiossemicarbazona. O composto **3c** exibe mais um o sinal referente ao metil da tiossemicarbazona. Ele se apresenta como um tripleto em 1,83 ppm com os hidrogênios acoplando entre si com  $J^3=6,6$  Hz (Figura 21).

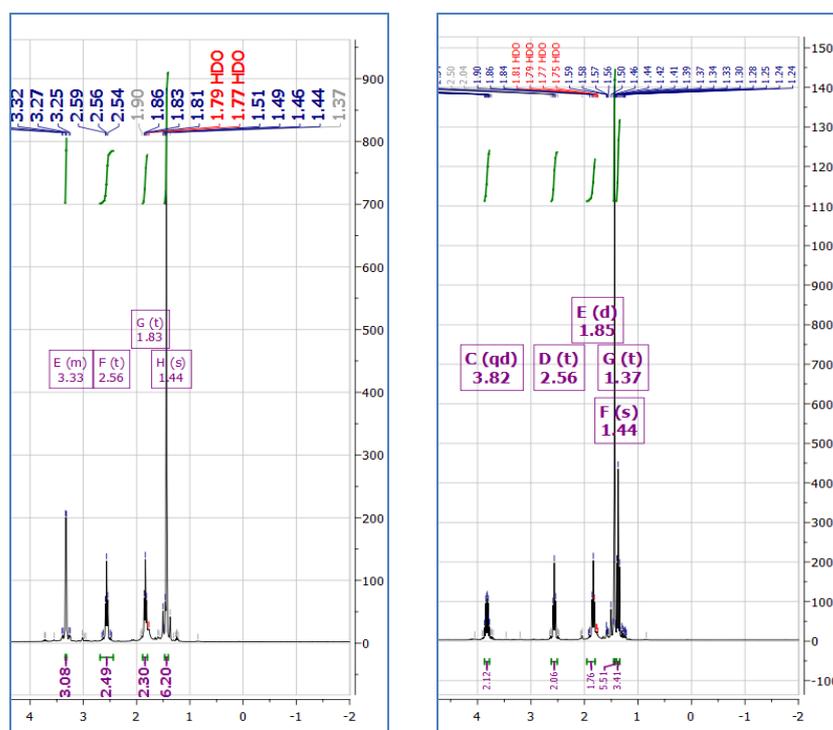
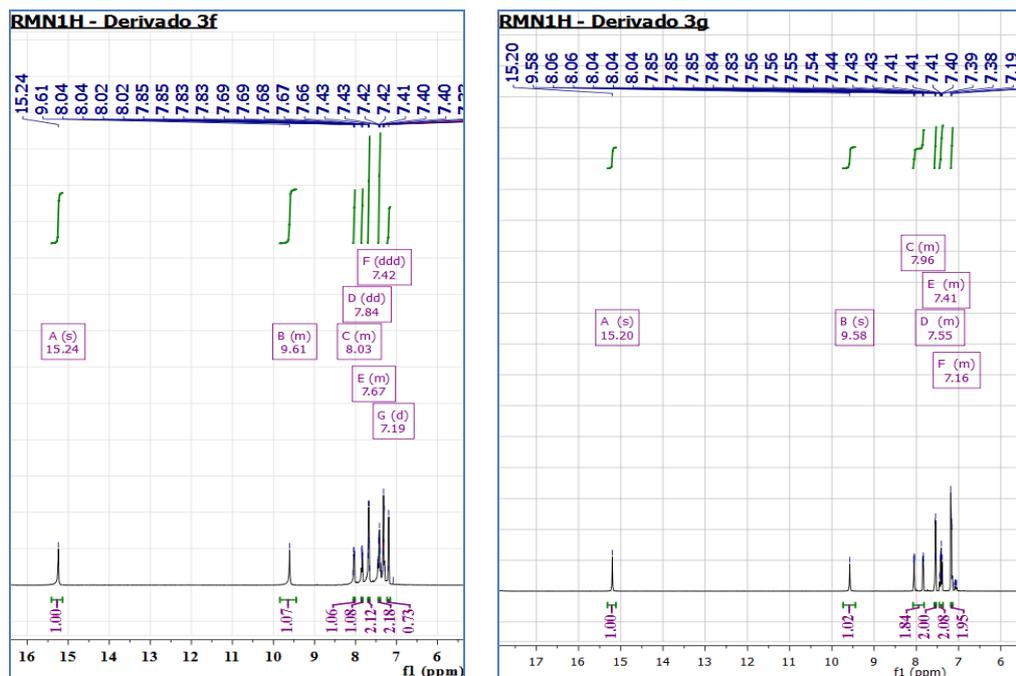


Figura 21 – RMN<sup>1</sup>H demonstrando os sinais das metilas nos compostos **3c** (esquerda) e **3d** (direita).

Os Hidrogênios Aromáticos apresentam-se majoritariamente como multipletos na região de entre 7 – 8 ppm (Figura 22).



**Figura 22 - RMN<sup>1</sup>H demonstrando os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos e das aminas nos compostos 3f (esquerda) e 3g (direita).**

O hidrogênio correspondente ao nitrogênio hidrazínico aparece como singlete entre 14-15 ppm. O Nitrogênio aromático, mais blindado, exibe deslocamento entre 9-10 ppm (Figura 22).

#### 5.1.4.2.4 Análise dos produtos dos espectros de massa e perfil de fragmentação dos derivados 3a-3h

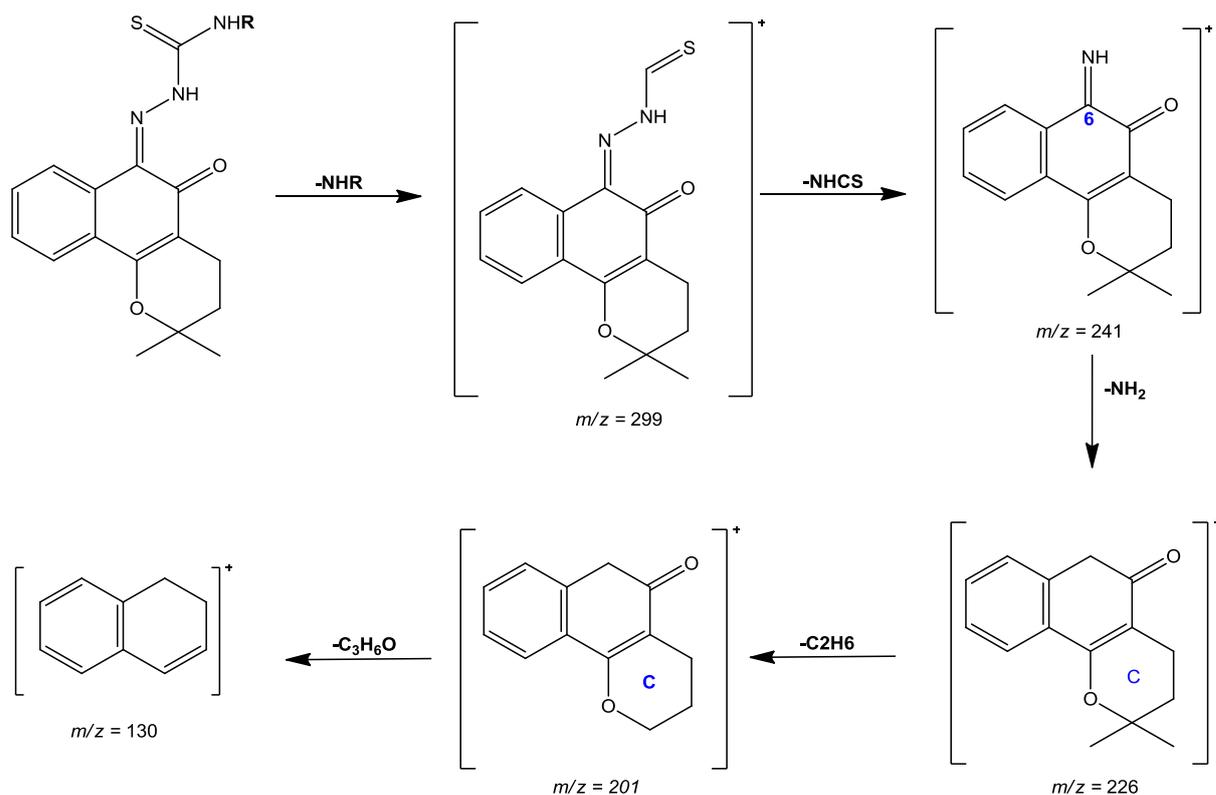
Os espectros de massa de alta resolução (Tabela 7) demonstraram uma similaridade no perfil de fragmentação dos derivados sintetizados e da  $\beta$ -lapachona.

Os derivados **3a-3h** iniciam o processo perdendo a porção amina terminal substituída dando origem à molécula com  $m/z = 299$  (Esquema 25). Em seguida, há a perda da parte referente à tiossemicarbazona (NHCS,  $m/z = 58$ ), restando apenas o nitrogênio da função imina ligado ao carbono C-6 do núcleo da naftoquinonas.

**Tabela 7 – Relação da fórmula molecular e do pico m/z.**

<b>Composto</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Pico [m/z]</b>
<b><math>\beta</math>-lapachona</b>	$C_{15}H_{14}O_3$	$[243,1021]^+$
<b>3a</b>	$C_{16}H_{17}N_3O_2S$	$[316,1120]^+$
<b>3b</b>	$C_{22}H_{21}N_3O_2S$	$[392,1427]^+$
<b>3c</b>	$C_{17}H_{19}N_3O_2S$	$[328,1153]^-$
<b>3d</b>	$C_{18}H_{21}N_3O_2S$	$[344,1348]^+$
<b>3e</b>	$C_{22}H_{20}N_4O_4S$	$[437,1278]^+$
<b>3f</b>	$C_{22}H_{20}ClN_3O_2S$	$[426,0973]^+$
<b>3g</b>	$C_{23}H_{23}N_3O_2S$	$[406,1583]^+$
<b>3h</b>	$C_{22}H_{19}Cl_2N_3O_2S$	$[460,0777]^+$

A etapa seguinte é a perda da função imina, gerando uma molécula com  $m/z = 226$ . A partir desta molécula o processo de fragmentação da  $\beta$ -lapachona e dos derivados é igual. Então, a estrutura resultante perde os dois grupos metila ( $m/z = 25$ ) presentes no anel C heterocíclico, originando uma molécula de  $m/z = 201$ . A última etapa observada é a perda total do anel C dando origem ao naftaleno ( $m/z = 130$ ).



**Esquema 23 – Rota de fragmentação dos derivados 3a-3h**

### 5.1.5 Tentativas de síntese do produto BV-NO<sub>2</sub>

Com o intuito de nitrar a β-lapachona para obter o produto BV-NO<sub>2</sub>, foram executados alguns experimentos.

- **Procedimento 1:**

Nesta primeira reação, foram utilizadas a β-lapachona, ácido nítrico concentrado e anidrido acético, em banho de gelo e agitação. Após 1h foi observada na CCD, uma mancha de coloração vermelha, típica de produtos nitrados, logo abaixo da mancha da β-lapachona. A reação foi mantida sob agitação por 20 horas, então foi vertida em gelo, onde foi notada a precipitação de sólido laranja. Após filtração, e CCD, foi concluído que o sólido retido era a β-lapachona.

A mesma metodologia foi testada sem a utilização do anidrido acético, apenas com ácido nítrico, assim como, foi testada também uma mistura de ácido nítrico concentrado e ácido sulfúrico concentrado 1:1. Em nenhuma delas, obteve-se o produto desejado.

#### **5.1.6 Tentativas para a obtenção do ciclo 4-tiazolidinona**

Com a intenção de obter o ciclo da 4-tiazolidinona, a partir da ciclização da porção tiossemicarbazona do derivado **3b**, dando origem ao produto 4b, foram realizados inúmeros experimentos com diferentes catalisadores e reagentes, partindo das metodologias relatadas na literatura (GÓES; TENÓRIO, 2005a, 2005b).

- **Procedimento 1:**

Utilizando como base a reação descrita por Góes e Colaboradores ( GÓES; TENÓRIO et al., 2005a, 2005b), neste experimento, reagimos a 3b com 4,5 equivalentes de Anidrido maléico, em meio utilizando a solução etanol/água 2:1 como solvente. A reação foi processada em micro-ondas por 60 minutos (100 W, 100°C). Ao final deste tempo, a CCD demonstrou que reagente de partida não tinha sido consumido. Então, foram adicionados 0,5 equivalentes de ácido p-tolueno-sulfônico, e a reação foi irradiada por mais 60 minutos. A **3b** não foi consumida, tampouco houve a formação do produto desejado.

Essa mesma metodologia também foi testada no aparelho de ultrassom, mas não houve a formação do produto e nem de subprodutos reacionais.

- **Procedimento 2:**

Nesta tentativa, mantivemos os reagentes de partida e substituímos apenas o solvente por DMF. A reação foi irradiada por 10 minutos e o 3b (reagente de partida) foi totalmente consumido e foi observado o aparecimento de uma nova mancha na CCD que poderia o provável produto. Porém, após a realização de extração e coluna cromatográfica, não houve isolamento do produto.

A mesma metodologia foi realizada utilizando o xileno como solvente. A reação foi irradiada por 15 minutos para que houvesse o consumo completa da 3b. A reação foi

purificada e enviada para espectrometria de massa, na qual se observou que não era o produto desejado.

- **Procedimento 3:**

Como última alternativa de solvente, foi testado o tetracloreto de carbono. Utilizamos a 3b e o anidrido maléico, porém a reação foi irradiada por 6 horas e não houve a formação de nada. Então, foi adicionado o ácido *p*-tolueno-sulfônico e a reação foi irradiada por mais 35 minutos. Neste tempo, toda a 3b foi consumida e houve o aparecimento de novas manchas laranja.

A mesma metodologia anterior foi testada numa reação convencional, onde reagimos a 3b com o anidrido maléico em tetracloreto de carbono, sob refluxo 85 % por 7 h. Não houve formação de produto. Então, foi adicionado o ácido *p*-tolueno-sulfônico e após 5 dias, toda a 3b foi consumida. Foi realizada, novamente, uma placa preparativa e a substância indicada como provável produto foi isolada e mandada para massa de alta resolução. Porém, o resultado não foi compatível com o da molécula esperada.

- **Procedimento 4:**

Como não obtivemos sucesso nas reações anteriores, onde utilizamos a  $\beta$ -lapachona já substituída com a tiossemicarbazona (3b). Neste experimento, reagimos a  $\beta$ -lapachona com 2,5 equivalentes de isotiocianato de fenila, 2,5 eq. de hidrazina 80%, 2 eq. de anidrido maléico e 0,5 eq. de APTS, em meio etanólico, tentando uma reação *one-pot*. A mistura reacional foi irradiada por 45 minutos, onde foi observada a formação do 3b. A reação foi irradiada no micro-ondas por mais 80 minutos, neste tempo, todo o 3b foi consumido, porém ainda havia muita  $\beta$ -lapachona e vários subprodutos reacionais.

Houve outras tentativas com a mesma metodologia, variando apenas os equivalentes dos reagentes, e os parâmetros do micro-ondas. Porém, em nenhuma dela, houve sucesso.

## 5.2 *Avaliação Biológica*

Nesta seção encontram-se os resultados obtidos nas avaliações esquistosomicida e antimicrobiana *in vitro*, assim como, a discussão das mesmas.

### 5.2.1 Avaliação esquistossomicida

A  $\beta$ -lapachona, uma orto-naftoquinona derivada do lapachol, possui atividade antiparasitária reconhecida que está relacionada ao seu potencial de produzir estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio (BOURGUIGNON et al., 2011; SILVA et al., 2005). A similaridade estrutural existente entre o esqueleto do Praziquantel e a  $\beta$ -lapachona conduziu-nos a investigar a atividade esquistossomicida dessa naftoquinona a qual demonstrou redução, *in vivo*, da carga de vermes em camundongos infectados com *S. mansoni* e morte de 100% dos vermes incubados com concentração de 100  $\mu$ M, *in vitro*, durante 24 horas de exposição (AIRES et al., 2014a, 2014b).

Analisando o âmbito de descobertas de novas drogas com atividade terapêutica, evidenciamos que a modificação estrutural de substâncias biologicamente ativas já existentes é uma estratégia interessante economicamente que visa à obtenção de novos fármacos a partir de análogos estruturais possuindo propriedades farmacológicas aprimoradas.

Neste contexto e com base nos promissores resultados obtidos por nosso grupo ao testar a atividade esquistossomicida da  $\beta$ -lapachona (1,2-naftoquinona) e considerando a atividade antiparasitária das tiossemicarbazonas, foram sintetizadas novas tiossemicarbazonas derivadas de 1,2-naftoquinona.

A  $\beta$ -lapachona e seus derivados tiossemicarbazonas (3a-3h) foram avaliados quanto a sua atividade esquistossomicida, utilizando o praziquantel (10  $\mu$ M) como controle positivo e meio RPMI como controle negativo. Foram avaliados *in vitro* os efeitos sobre a motilidade, desacasalamento e mortalidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos a concentrações crescentes da  $\beta$ -lapachona e seus derivados.

Os vermes do controle negativo apresentaram durante todo o tempo de observação, ondas características e movimentos peristálticos ao longo do corpo, com ocasional aderência da ventosa ventral à placa de cultura. Os vermes do controle positivo apresentaram imediata paralisia espástica mostrando o corpo encurtado e assumindo majoritariamente a forma de meia-lua. Em 24 horas, todos vermes do controle positivo encontravam-se mortos (Tabela 8).

O efeito esquistossomicida foi apresentado pela  $\beta$ -lapachona e o derivado 3a. Em 24 horas, 58% dos vermes estavam mortos (score = 0) quando incubados com a beta-lapachona na concentração de 50  $\mu$ M. Essa atividade se mostrou dose-dependente, alcançando o efeito

máximo na concentração de 100  $\mu\text{M}$  ainda nas primeiras 24 horas corroborando com efeito obtido em trabalho anterior do grupo (AIRES et al., 2014b). O composto 3a apresentou o efeito esquistosomicida a partir de 72 horas na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , 83% dos vermes estavam mortos em 120 horas.

O comportamento da  $\beta$ -lapachona e seus derivados em separar machos e fêmeas de *S. mansoni* variaram de acordo com a concentração e o tempo de incubação. A  $\beta$ -lapachona e o 3f foram efetivos em separar os vermes de *S. mansoni* e mantê-los desacasalados em 24 horas de incubação nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Ambos,  $\beta$ -lapachona e 3f, neste mesmo intervalo, alcançaram efeito máximo na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Nessa mesma concentração 3a alcançou efeito máximo no período de 120 horas e 3e em 72 horas na concentração de 200  $\mu\text{M}$ .

Durante as 120 horas de observação todos os vermes de *S. mansoni* do grupo controle negativo apresentaram movimentos típicos caracterizados por ondas peristálticas ao longo do corpo e contrações das ventosas oral e ventral, com ou sem aderência a placa de cultura (score = 3).

Após 24 horas de incubação com os derivados 3g e 3h, em todas as concentrações, 100 % dos vermes apresentaram redução da motilidade com diminuição da frequência das ondas e movimentos peristálticos, além da incapacidade de adesão à superfície da placa através das ventosas (score = 2). Esse comportamento também foi observado com os derivados 3a na concentração 25  $\mu\text{M}$  e com os derivados 3b, 3c, 3e, 3f, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  após 24 horas.

Tabela 8 – Avaliação Esquistossomicida *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e dos derivados 3a-3h

Grupos	Doses	24 Horas				72 horas				120 horas						
		(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade					
		DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3
Controle Positivo	PZQ 10 $\mu$ M	0	100	-	-	-	0	100	-	-	-	0	100	-	-	-
Controle Negativo	RPMI	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
$\beta$ -lapachona	12,5 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
	25 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
	50 $\mu$ M	17	58	42	-	-	83	100	-	-	-	100	100	-	-	-
	100 $\mu$ M	100	100	-	-	-	100	100	-	-	-	100	100	-	-	-
	200 $\mu$ M	100	100	-	-	-	100	100	-	-	-	100	100	-	-	-
3a	12,5 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	8	92	0	17	8	75	-
	25 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	0	58	42	-	33	17	58	25	-
	50 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	8	50	42	-	50	42	58	-	-
	100 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	33	50	17	-	100	50	25	25	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	42	33	25	-	100	83	17	-	-
3b	12,5 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
	25 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
	50 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	8	17	75	0	-	8	17	75
	100 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	-	8	92	-	0	-	33	67	-

DV: desacasamento dos vermes. **Score de motilidade:** 0 (morto); 1 (poucos movimentos ou sem movimento, porém vivo); 2 (diminuição dos movimentos normais); 3 (movimentos normais).

Continuação Tabela 8 – Avaliação Esquistossomícida *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e dos derivados 3a-3h

Grupos	Doses	24 Horas				72 horas				120 horas						
		(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade					
		DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3
3c	12,5 $\mu$ M	0	-	-	-	100	25	-	-	75	25	25	-	8	92	-
	25 $\mu$ M	0	-	-	50	50	25	-	-	67	33	25	-	67	33	-
	50 $\mu$ M	0	-	-	75	25	50	-	-	75	25	50	-	17	83	-
	100 $\mu$ M	0	-	-	100	-	50	-	-	100	-	50	-	75	25	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	100	-	67	-	-	100	-	83	-	67	34	-
3d	12,5 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 $\mu$ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	42	58	0	-	50	50	-
3e	12,5 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100
	25 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	-	-	100	0	-	50	-	50
	50 $\mu$ M	0	-	-	-	100	0	-	33	8	58	0	-	100	-	-
	100 $\mu$ M	0	-	50	50	-	50	-	50	50	-	50	-	100	-	-
	200 $\mu$ M	0	-	42	58	-	100	-	100	-	-	100	-	100	-	-

**DV:** desacasalamento dos vermes. **Score de motilidade:** 0 (morto); 1 (poucos movimentos ou sem movimento, porém vivo); 2 (diminuição dos movimentos normais); 3 (movimentos normais).

**Continuação Tabela 8 – Avaliação Esquistossomicida *in vitro* da  $\beta$ -lapachona e dos derivados 3a-3h**

Grupos	Doses	24 Horas				72 horas				120 horas						
		(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade			(%)	Percentual (%) de vermes no score de motilidade					
		DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3	DV	0	1	2	3
3f	12,5 $\mu$ M	0	-	-		100	17	-	-	-	100	17	-	-	42	67
	25 $\mu$ M	17	-	-		100	33	-	-	-	100	50	-	-	100	-
	50 $\mu$ M	66	-	-		100	84	-	-	50	50	84	-	-	100	-
	100 $\mu$ M	100	-	-	100		100	-	-	100		100	-	-	100	-
	200 $\mu$ M	100	-	-	100		100	-	-	100		100	-	-	100	-
3g	12,5 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-
	25 $\mu$ M	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-	0	-	-	100	-
	50 $\mu$ M	0	-	-	100	-	34	-	-	100	-	83	-	-	100	-
	100 $\mu$ M	16	-	-	100	-	34	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	100	-	50	-	-	100	-	83	-	-	100	-
3h	12,5 $\mu$ M	0	-	-	100	-	17	-	-	100	-	50	-	-	100	-
	25 $\mu$ M	0	-	-	100	-	34	-	-	100	-	50	-	-	100	-
	50 $\mu$ M	0	-	-	100	-	50	-	-	100	-	67	-	-	100	-
	100 $\mu$ M	0	-	-	100	-	75	-	-	100	-	83	-	-	100	-
	200 $\mu$ M	0	-	-	100	-	83	-	-	100	-	83	-	-	100	-

**DV:** desacasamento dos vermes. **Score de motilidade:** 0 (morto); 1 (poucos movimentos ou sem movimento, porém vivo); 2 (diminuição dos movimentos normais); 3 (movimentos normais).

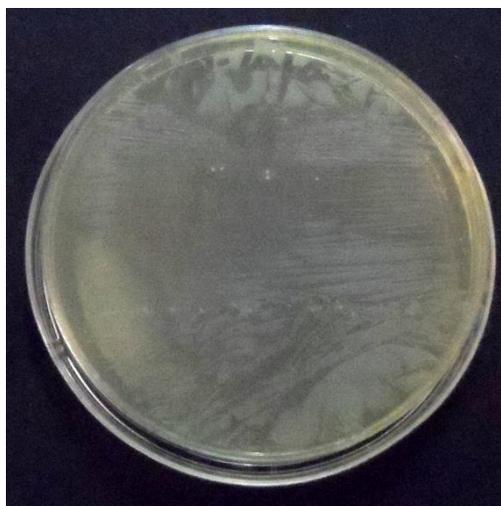
A  $\beta$ -lapachona e seus derivados, 3a e 3e, causaram diminuição significativa na motilidade dos vermes, apresentando apenas movimentos nas extremidades (score = 1). Após 24 horas, a  $\beta$ -lapachona e o derivado 3e mostraram esse efeito em 42% dos vermes na concentração de 50  $\mu$ M e 200  $\mu$ M, respectivamente. O composto 3e, na mesma concentração e após 72 horas, apresentou 100% dos vermes no score 1. Vermes incubados com 3a também apresentaram diminuição significativa na motilidade exibindo apenas movimentos nas extremidades a partir da concentração de 25  $\mu$ M, após 72 horas.

O tegumento do *S. mansoni* está envolvido no processo de proteção contra o sistema imune do hospedeiro, além ser essencial na nutrição, excreção, osmoregulação e transdução de sinais o que o torna alvo para ação de drogas (MANNECK; HAGGENMÜLLER; KEISER, 2010). A  $\beta$ -lapachona e o derivado 3a causaram nos vermes alterações tegumentares perceptíveis em microscopia óptica. Ambos ocasionaram a formação de bolhas ao logo do tegumento do verme, mas apenas aqueles incubados com a  $\beta$ -lapachona apresentaram descamação do tegumento. Aires e colaboradores (2014) já haviam analisado as alterações tegumentares, através de microscopia eletrônica, causadas pela exposição à  $\beta$ -lapachona durante intervalo de 24 horas. Descamação, erosão do tegumento e outras alterações foram observadas tal como foi observado pela ação da miltefosina e mefloquina (BERTÃO et al., 2012; HOLTFRETER et al., 2011). Como sugerido por todos os autores, nos também consideramos que a beta exibe sua propriedade esquistossomicida interferindo na estabilidade da membrana e integridade estrutural do tegumento.

### 5.2.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Dos nove compostos testados, a  $\beta$ -lapachona apresentou o melhor resultado com CIM igual a 64  $\mu$ g/mL para todos os micro-organismos avaliados (Figura 23), enquanto que os derivados apresentaram  $CIM \geq 128 \mu$ g/mL. Macedo e colaboradores (2013), em trabalho recente com os mesmo micro-organismos, encontraram que eles são resistentes a diversos antibióticos como ampicilina, cefoxitina, ciprofloxacino, gentamicina, amicacina entre outros. Quanto aos resultados, estes foram comparados aos obtidos por Macedo e colaboradores (2013), e verificamos que os valores da CIM dos derivados obtidos neste

trabalho foram inferiores ou iguais aos encontrados para a ampicilina e cefoxitina frente às mesmas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MACEDO et al., 2013).

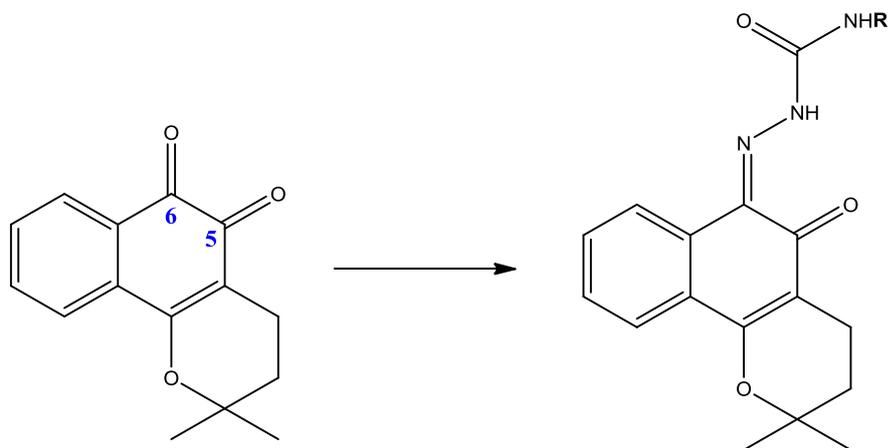


**Figura 23 – Placa de cultura da  $\beta$ -lapachona na concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ .**

A diminuição da atividade dos derivados em relação à  $\beta$ -lapachona demonstrou que a inserção da porção da tiossemicarbazona na  $\beta$ -lapachona não aumenta a atividade, apesar destas moléculas possuírem atividade antimicrobiana reconhecida quando utilizadas separadamente. A diminuição da atividade anti-SARM pode ser explicada pela alteração do núcleo quinonóico da  $\beta$ -lapachona através da inserção da porção tiossemicarbazida na carbonila do C-6 (Figura 26). O sistema quinonóidico, próprio das naftoquinonas, confere uma característica marcante dessa classe que é o potencial redutor e, conseqüente, capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos (HILLARD et al., 2008).

Abreu e colaboradores (2005), em estudo eletroquímico da  $\beta$ -lapachona e de seus diazoderivados, demonstraram que a substituição da carbonila C-6 pela porção diazoquinona, diminuiu o caráter oxidativo do derivado em relação ao seu precursor ( $\beta$ -lapachona) reduzindo assim a atividade antimicrobiana (DE ABREU et al., 2005). Dessa forma, mesmo a tiossemicarbazona possuindo a atividade antibacteriana, parece que sua

ação não sobrepôs a perda da atividade oxidante obtida com a alteração do núcleo quinonóico.



**Figura 24 – Modificação do núcleo quinonóico da  $\beta$ -lapachona.**

Os resultados encontrados no presente trabalho para a  $\beta$ -lapachona corroboram aos encontrados por Macedo e colaboradores 2013, embora para algumas cepas a diferença seja de quatro diluições.

Apesar dos derivados sintetizados não terem demonstrado atividade antimicrobiana, a obtenção destas moléculas foi salutar uma vez que o desenvolvimento da resistência destas cepas aos antimicrobianos é alta e a terapia limitada à utilização de apenas três agentes antimicrobianos (teicoplanina, vancomicina, e a linezolida). Isto é mais preocupante porque deste pequeno arsenal terapêutico disponível, foram, recentemente, relatados na literatura casos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (RICHTER et al., 2011; VIDAILLAC et al., 2013).

## **6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Neste trabalho foram sintetizados 8 novas tiossemicarbazonas derivadas da  $\beta$ -lapachona (3a-3h) através de metodologias sintéticas fáceis, utilizando tanto o aquecimento convencional como o por irradiação de micro-ondas, e método de purificação simples. Entretanto, os derivados 4-tiazolidinonas não foram obtidos apesar das diversas tentativas realizadas.

Todos os derivados apresentaram rendimentos superiores a 75% quando utilizado o método por irradiação de micro-ondas, exceto os compostos 3g e 3h que exibiram rendimentos de 10% e 61,3%, respectivamente. A maioria dos derivados apresentou tempo reacional entre 2-5 minutos. Isto demonstra que a metodologia por irradiação por micro-ondas é eficaz, versátil e rápida para a obtenção, com bom rendimento, da maioria dos derivados.

Na metodologia convencional, a maioria dos compostos foram obtidos com rendimentos acima dos 76%, exceto o 3a, 3b e 3c que exibiram rendimentos entre 30 e 51%. Os tempos reacionais variaram entre 1 hora para o composto 3h e 5 dias para o derivado 3b. A metodologia convencional apesar dos tempos reacionais mais longos apresenta-se como um modo eficaz para a obtenção da maioria dos compostos com rendimentos satisfatórios.

Após serem caracterizados pelos métodos espectroscópicos de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IV e massa de alta resolução e suas propriedades físico-químicas serem determinadas todos os derivados e a  $\beta$ -lapachona passaram por avaliação do potencial antimicrobiano e esquistosomicida.

Os derivados foram avaliados frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM) e apresentaram concentração inibitória mínima (CIM  $\geq$  128 ug/mL) acima da obtida com a  $\beta$ -lapachona (CIM  $\geq$  64 ug/mL). No entanto, o valor da CIM apresentada pelos derivados é inferior àquela apresentada pela ampicilina (CIM  $\geq$  512 ug/mL), medicamento comercial utilizado na clínica. Vale salientar que houve dificuldade na solubilização dos compostos 3a-3h o que pode ter interferido no resultado final do teste.

Na avaliação *in vitro* frente a vermes do *Schistosoma mansoni*, dentre os derivados, 3a apresentou atividade esquistosomicida. Os derivados 3a, 3e e 3f, assim com a  $\beta$ -lapachona, alcançaram efeito máximo no desacasalamento dos vermes durante o período de exposição. Os compostos 3a, 3c, 3e, 3g e 3h mostraram efeito sobre a motilidade dos vermes, porém os

derivados 3a e 3e exibiram efeito mais significativo levando os vermes a diminuição severa da motilidade.

Como perspectiva temos o planejamento de novas reações para a síntese dos derivados com o ciclo 4-tiazolidinona. Obter complexos de inclusão dos compostos sintetizados com a metil- $\beta$ -ciclodextrina, com a finalidade de melhorar a solubilidade dos derivados para a realização das atividades biológicas.

Em relação à atividade esquistossomicida, o passo seguinte será a realização de ensaio de citotoxicidade baseado no brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) para avaliar a viabilidade do *Schistosoma mansoni* após o tratamento com o derivado 3a, único a apresentar atividade esquistossomicida. E, em seguida, realizar uma análise ultra-estrutural dos vermes de *S. mansoni* através de microscopia eletrônica de varredura, para analisar as lesões tegumentares provenientes da exposição aos derivados, principalmente ao composto 3a.

## **REFERÊNCIAS**

ADAM, D. Out of the kitchen. **Nature**, v. 421, p. 571–572, 2003.

AIRES, A. D. L. et al.  $\beta$ -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 261–7, 15 fev. 2014a.

AIRES, A. D. L. et al. Ultrastructural analysis of  $\beta$ -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental parasitology**, v. 142, p. 83–90, jul. 2014b.

ALVES, G. M. C. et al. Purificação e caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413–416, 2008.

ALVES, R. B. et al. Reações orgânicas clássicas auxiliadas por irradiação de micro-ondas. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 3, p. 214–224, 2010.

AMARAL, L.; BASTOS, M. P. Kinetics and Mechanism for benzaldehyde phenylhydrazone formation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 36, n. 22, p. 3412–3417, 1971.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. supl, p. 57–59, 2002.

BASSI, L.; PALITTI, F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1063–1070, 2000.

BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461–471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–9, jan. 2004.

BERTÃO, H. G. et al. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology research**, v. 110, n. 6, p. 2465–73, jun. 2012.

BOURGUIGNON, S. C. et al. Trypanosoma cruzi: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 160–6, jan. 2011.

BRASIL, C.-S. **Manual das doenças transmitidas por água e alimentos Esquistossomose Mansônica**. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN\\_Esquito.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN_Esquito.htm)>. Acesso em: 12 out. 2014.

BRINDLEY, P. J. et al. Helminth genomics: The implications for human health. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 10, p. e538, jan. 2009.

CAPUTTO, M. E. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6818–26, 15 nov. 2011.

CDC/ATLANTA/USA. DPDX, 2003 – DIVISION OF PARASITIC DISEASES. **Schistosoma mansoni**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 12 out. 2014.

CHENNA, P. H. DI et al. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono ( arylimino ) Derivatives of -Lapachone. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 15, p. 2486–2489, 2008.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology research**, v. 90 Supp 1, p. S3–9, jun. 2003.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; MORONI, R. Schistosoma mansoni: Hycanthone/Oxamniquine Resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Experimental parasitology**, v. 75, n. 4, p. 425–432, 1992.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Second Informational Supplement**. Volume 3 ed. Pensilvânia, EUA: [s.n.]. v. 32

CUNHA-FILHO, M. S. S. et al.  $\beta$ -lapachone. **Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications**, v. 62, n. Pt 8, p. o473–5, ago. 2006.

DA SILVA JÚNIOR, E. N. et al. Hooker's "lapachol peroxide" revisited. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 14, p. 1575–1577, abr. 2009.

DE ABREU, F. C. et al. Electrochemistry of  $\beta$ -lapachone and its diazoderivative: Relevance to their compared antimicrobial activities. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 7, p. 767–772, jul. 2005.

DE MOURA, K. C. G. et al. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[b-4,3]naphtho[1,2-d]imidazoles from beta-lapachone. **European journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 7, p. 639–45, jul. 2004.

EL'TSOV, O. S. et al. Synthesis and transformations of ( imidazolylimino ) thiazolidinones. v. 52, n. 2, p. 3–8, 2003.

EL-SHARIEF, M. A M. S. et al. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid)thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 67, p. 263–8, set. 2013.

ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta tropica**, v. 82, n. 2, p. 139–46, maio 2002.

ETTLINGER, M. G. Hydroxynaphthoquinones. II. Cyclization and the basicity and interconversion of ortho and para quinones. **Chemical Laboratory of Harvard University**, v. 72, n. 1936, p. 3090–3095, 1947.

FERRAZ, K. S. O. et al. 2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 20, p. 7138–44, 15 out. 2009.

FERREIRA, S. B. et al. Synthesis of  $\alpha$  - and  $\beta$  -Lapachone Derivatives from Hetero Diels-Alder Trapping of Alkyl and Aryl o-Quinone Methides. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1478–1482, 2009.

FERREIRA, S. B. et al.  $\beta$  -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais  $\beta$  -lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140–160, 2010.

FERREIRA, V. F. Aprendendo sobre os conceitos ácido e base. **Química NOva escolar**, v. 4, p. 1–2, 1996.

FORTUNY, M.; RAMOS, A. L. D.; DARIVA, C. Principais Aplicações das Microondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1553–1561, 2008.

GEDYE, R. et al. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 3, p. 279–282, jan. 1986.

GIGUERE, R. J. et al. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 41, p. 4945–4948, jan. 1986.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 23, p. 2612–28, 21 jun. 2008.

HOLTFRETER, M. C. et al. Schistosoma mansoni: schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine in vitro. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 270–6, jan. 2011.

HOOKER, C. The Constitution of Lapachol and its derivatives. Part V. The Structure of Paternò's "Isolapachone." **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 68, n. 8, p. 1190–1197, 1936.

HOOKER, S. C. LVII.- The constitution of "lapachic acid" (lapachol) and its derivatives. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 61, p. 611, 1892.

HOOKER, S. C. C.-The constitution of lapachol and its derivatives. Part II. The azines of the lapachol group. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 63, n. 1376, p. 1376, 1893.

HOOKER, S. C. LXXXVII.-The constitution of lapachol and its derivatives. Part III. The structure of the amylene chain. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 69, p. 1355, 1896.

HOTEZ, P. J. **Forgotten People, Forgotten Diseases: The Neglected Tropical Diseases and Their Impact on Global Health and Development**. 1<sup>a</sup> Edition ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2008. p. 215

HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1311–21, abr. 2008.

HOTEZ, P. J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1475, jan. 2012.

HU, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 64, p. 292–301, jun. 2013.

JAIN, A. K. et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3378–95, 1 jun. 2012.

KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 43, n. 46, p. 6250–84, 26 nov. 2004.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 1, p. 51–63, jan. 2006.

KAPPE, C. O.; LARHED, M. All the Rave in Microwaves. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, p. 7666–7669, 2005.

KAVITHA, C. V et al. Synthesis of new bioactive venlafaxine analogs: novel thiazolidin-4-ones as antimicrobials. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 7, p. 2290–9, 1 abr. 2006.

LAMMIE, P. J. et al. Eliminating lymphatic filariasis, onchocerciasis, and schistosomiasis from the americas: breaking a historical legacy of slavery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 2, p. e71, jan. 2007.

LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3749–57, 1 jun. 2006.

LESSA, J. A et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5671–7, dez. 2010.

LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B. Microwave assisted organic synthesis Da review. v. 57, n. 589, 2001.

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

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, out. 2009a.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247–253, out. 2009b.

MACEDO, L. et al.  $\beta$ -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 25–9, 15 dez. 2013.

MAHAJAN, A. et al. Meclonazepam analogues as potential new antihelmintic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 7, p. 2333–6, 1 abr. 2008.

MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 85–98, jan. 2010.

MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 8, p. e504, jan. 2009.

MENEZES, C. M. S. et al. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationship of clonazepam, meclonazepam, and 1,4-benzodiazepine compounds with schistosomicidal activity. **Chemical biology & drug design**, v. 79, n. 6, p. 943–9, jun. 2012.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 12, p. 2306–15, 10 nov. 2010.

MOGILAIHAH, K. et al. Note Microwave-enhanced Knoevenagel condensation catalysed by  $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{NH}_2$ . **Indian Journal of Chemistry**, v. 49, n. March, p. 390–393, 2010.

MUSHTAQUE, M.; AVECILLA, F.; AZAM, A. Synthesis, characterization and structure optimization of a series of thiazolidinone derivatives as *Entamoeba histolytica* inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 55, p. 439–48, set. 2012.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. In: MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. (Ed.). . **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 193–212.

OSSOWSKI, T. et al. Determination of the pK<sub>a</sub> Values of some Biologically Active and Inactive Hydroxyquinones. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 19, n. 1, p. 175–183, 2008.

PAVAN, F. R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898–905, maio 2010.

PELOSI, G. et al. Antiretroviral activity of thiosemicarbazone metal complexes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8765–9, 23 dez. 2010.

PICA-MATTOCCIA, L. et al. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 82–5, jul. 2009.

PICHOWICZ, M. et al. Microwave-assisted synthesis of 4-amino-3,5-dihalopyridines. **Tetrahedron**, v. 66, n. 13, p. 2398–2403, mar. 2010.

PINTO, A. V. et al. Schistosomiasis mansoni: blocking of cercarial penetration by chemical agents: I. Naphtoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 2, p. 133–135, 1977.

PNUD. **Relatório do Desenvolvimento Humano 2013 - A Ascensão do Sul: Progresso Humano num Mundo Diversificado**. Communicat ed. New York: Organização das Nações Unidas, 2013. p. 224

**Processo para a preparação de derivados naftopirano substituídos**. Portugal, 1985.

RAWAL, R. K. et al. Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1725–31, 15 fev. 2007.

REY, L. Esquistossomíase Mansônica: o parasito. In: **As bases da parasitologia médica**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 153–182.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. Schistosomiasis - a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology research**, v. 99, n. 5, p. 505–21, out. 2006.

RICHTER, S. S. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4203–7, dez. 2011.

SADHU, P. S. et al. Synthesis of new praziquantel analogues: potential candidates for the treatment of schistosomiasis. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 2, p. 1103–6, 15 jan. 2012.

SAIZ, C. et al. Microwave assisted tandem reactions for the synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones. **Tetrahedron letters**, v. 50, n. 8, p. 901–904, 25 fev. 2009.

SALAS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 2, p. 668–74, 15 jan. 2008.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660–667, 2002.

SCHAFFNER-SABBA, K. et al.  $\beta$ -lapachone: Synthesis of derivatives and activities in tumor models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 990–994, set. 1984.

SILVA, M. N. et al. Synthesis of new aldehyde derivatives from  $\beta$ -lapachone and nor- $\beta$ -lapachone. **ARKIVOC**, v. 2003, n. x, p. 156–168, 2003.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, C. B. V. DE. Divulgação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 1, p. 193–6, 3 jan. 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica De Compostos Orgânicos**. 6<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: John Wiley and Sons, 2000.

SRIVASTAVA, T.; HAQ, W.; KATTI, S. . Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. **Tetrahedron**, v. 58, n. 38, p. 7619–7624, set. 2002.

SVS/MS, S. DE V. EM S. M. –. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7<sup>a</sup> Edição ed. Brasília - DF: [s.n.]. p. 19–27

TENÓRIO, R. P. et al. Tiosemicarbazonas: Métodos de obtenção. aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005a.

TENÓRIO, R. P. et al. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-Toxoplasma gondii activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 10, p. 2575–8, 16 maio 2005b.

THOMSON, R. H. Distribution of naturally occurring quinones. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition**, v. 13, n. November 1990, p. 70–73, 1991.

TRACY, JW ; WEBSTER, L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. In: GILMAN, G. & (Ed.). . **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11<sup>a</sup>. ed. RIO de Janeiro: McGraw-Hill Medical; 11 edition, 2011. p. 841–855.

VANDRESEN, F. et al. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 79, p. 110–6, 22 maio 2014.

VEJA.COM. **Brasil desenvolve primeira vacina contra esquistossomose - Saúde - Notícia - VEJA.com**. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/saude/brasil-desenvolve-primeira-vacina-contr-esquistossomose>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone--a Biologically Active Scaffold. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 5, p. 897–905, maio 2008.

VERMA, R. P.; HANSCH, C. Elucidation of structure-activity relationships for 2- or 6-substituted-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 22, p. 5997–6009, 15 nov. 2004.

VIDAILLAC, C. et al. Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 1, p. 67–74, jul. 2013.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. C. S.; COSTA, A. DE P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle \*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39–45, 2012.

WEI, P. et al. New potential inhibitors of DNA topoisomerase. Part II: Design and synthesis of alpha-lapachone derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 3, p. 828–30, 1 fev. 2009.

WHO. **WHO | Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva: [s.n.].

WHO. **WHO | Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva: [s.n.].

WHO. **WHO | Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/#.U4MIPWQao8U.mendeley](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/#.U4MIPWQao8U.mendeley)>. Acesso em: 26 maio. 2014.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–75, jan. 2008.

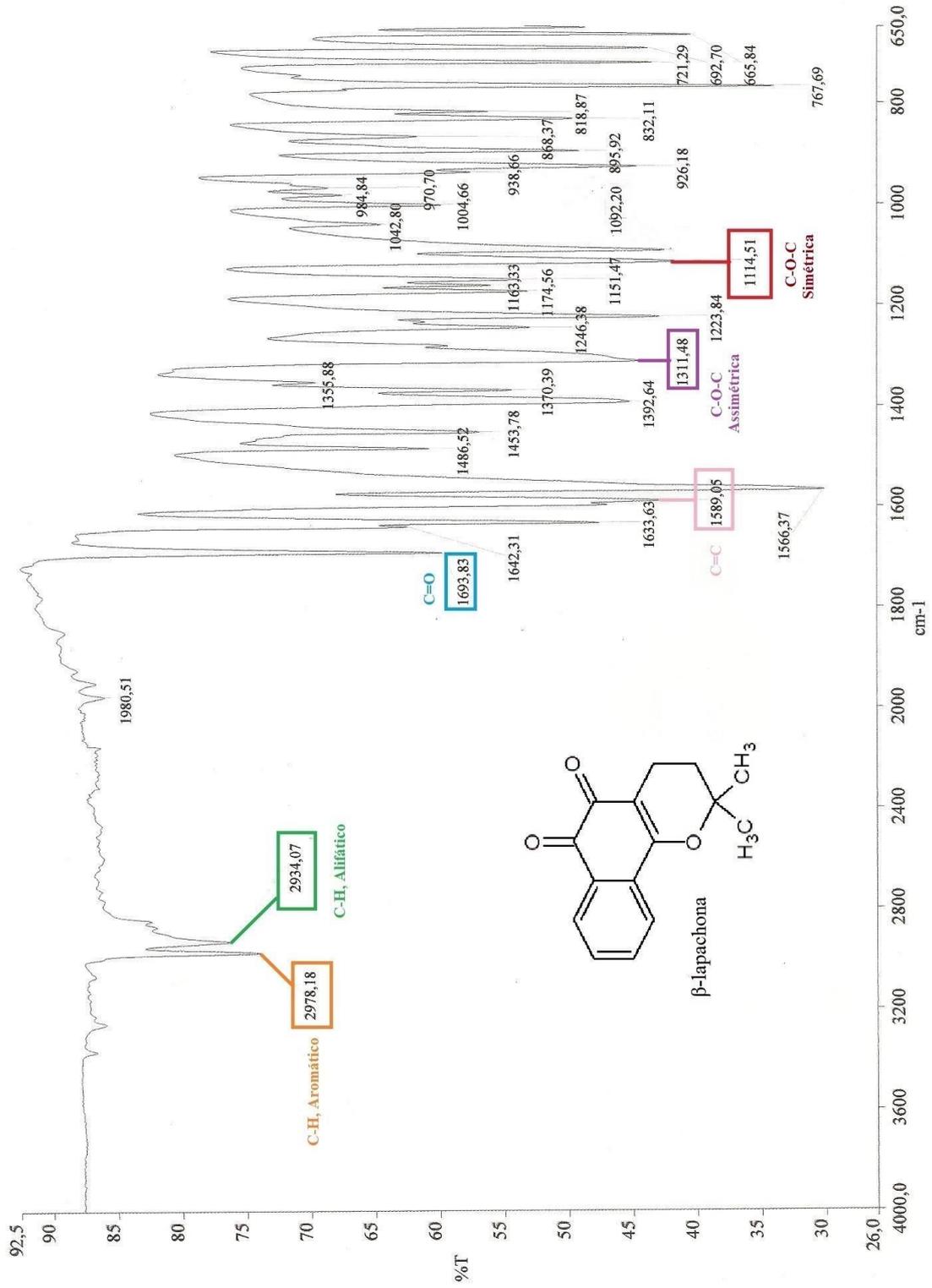
WU, W.; WANG, W.; HUANG, Y.-X. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1501–7, dez. 2011.

ZHANG, X. et al. Ionic liquid mediated and promoted eco-friendly preparation of thiazolidinone and pyrimidine nucleoside-thiazolidinone hybrids and their antiparasitic activities. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 22, p. 6280–3, 15 nov. 2009.

**ANEXOS**

# Anexo 1 – Espectros da $\beta$ -lapachona

## Infravermelho



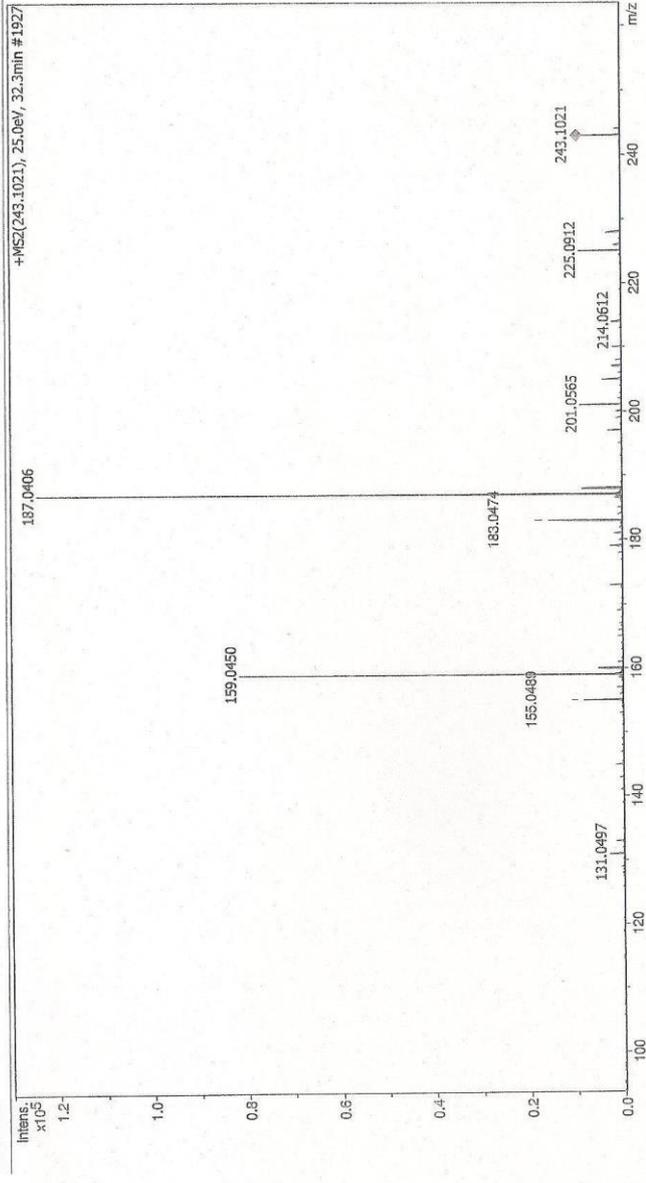
# Massa de alta resolução

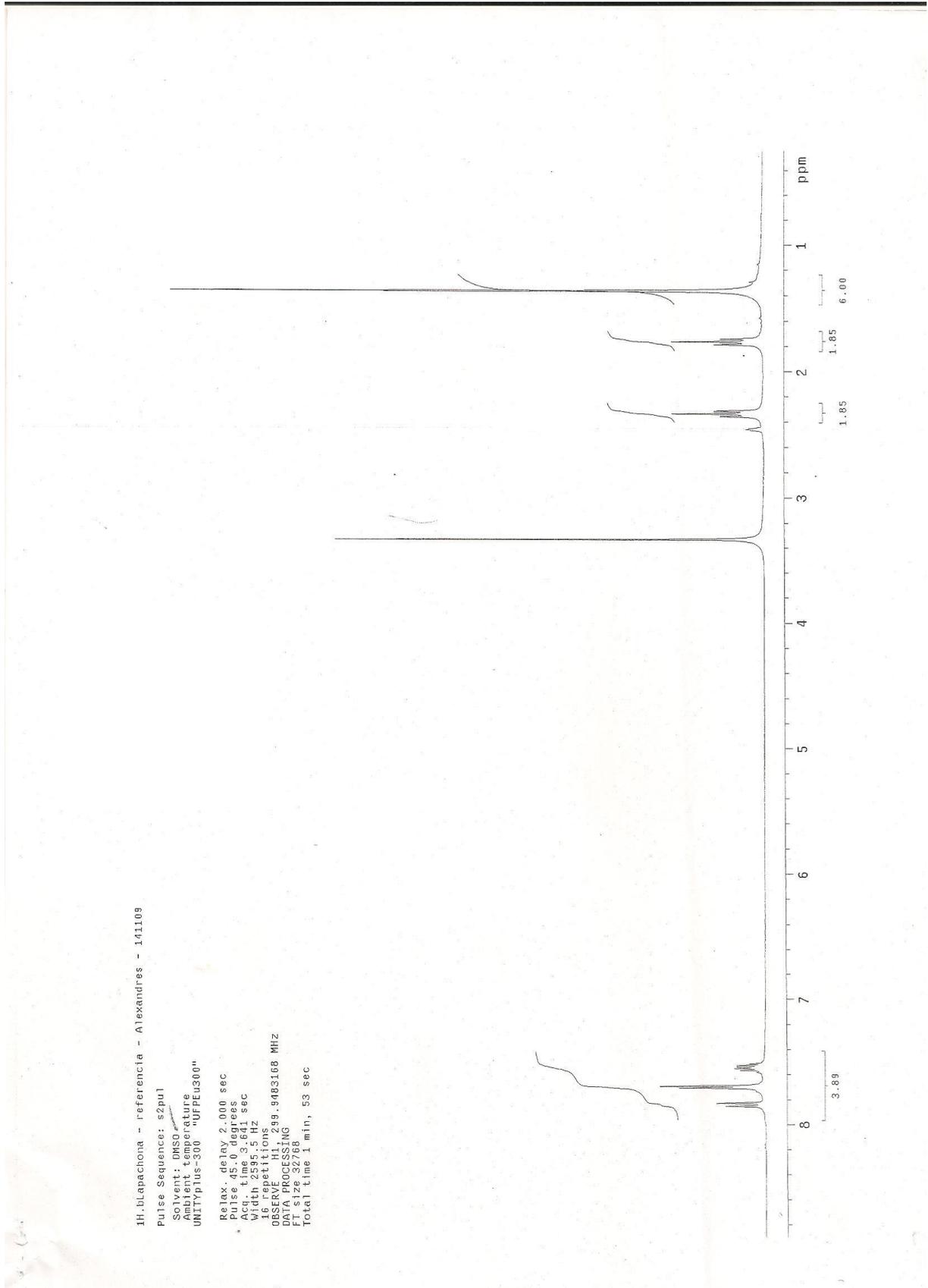
## Generic Display Report

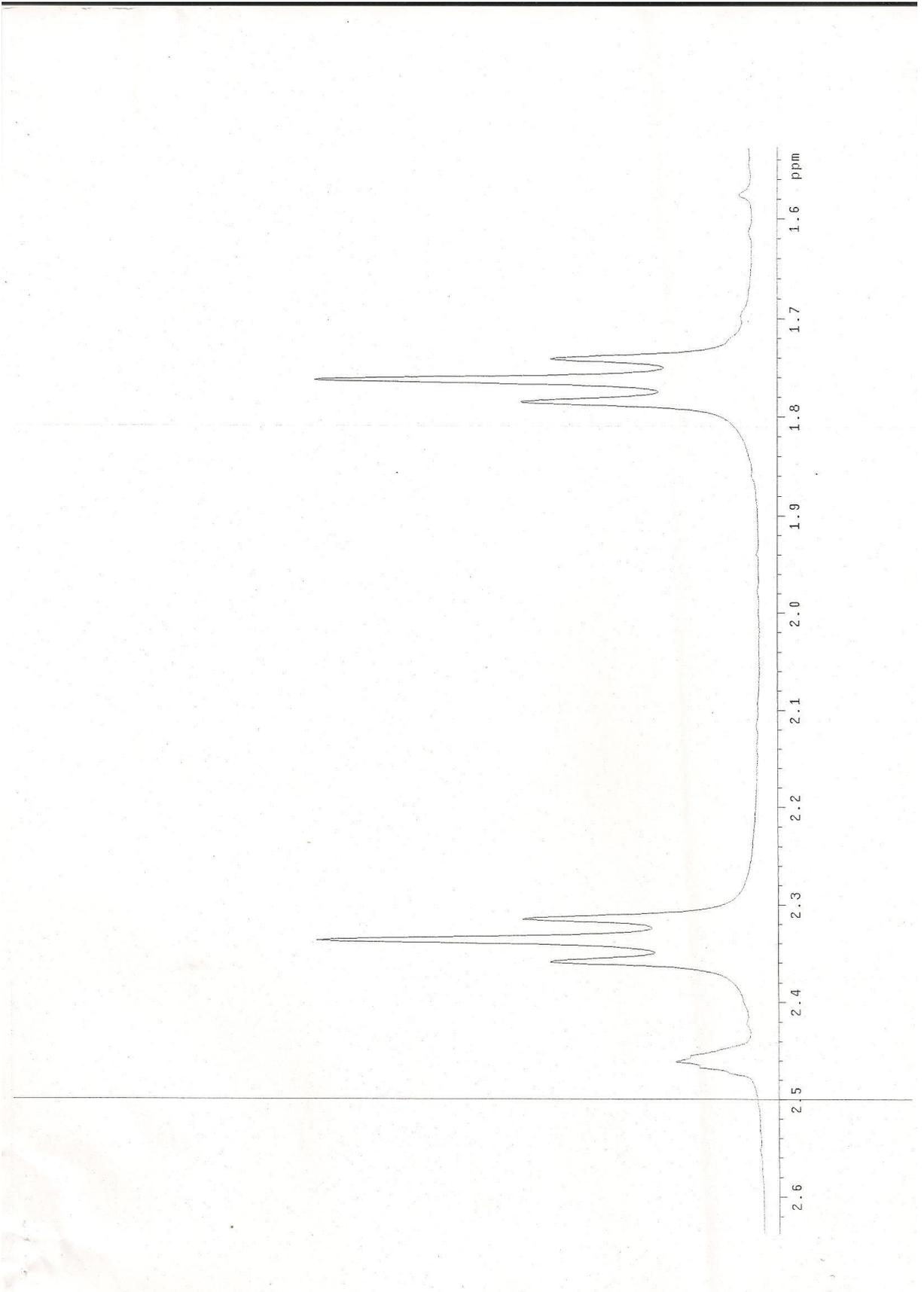
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

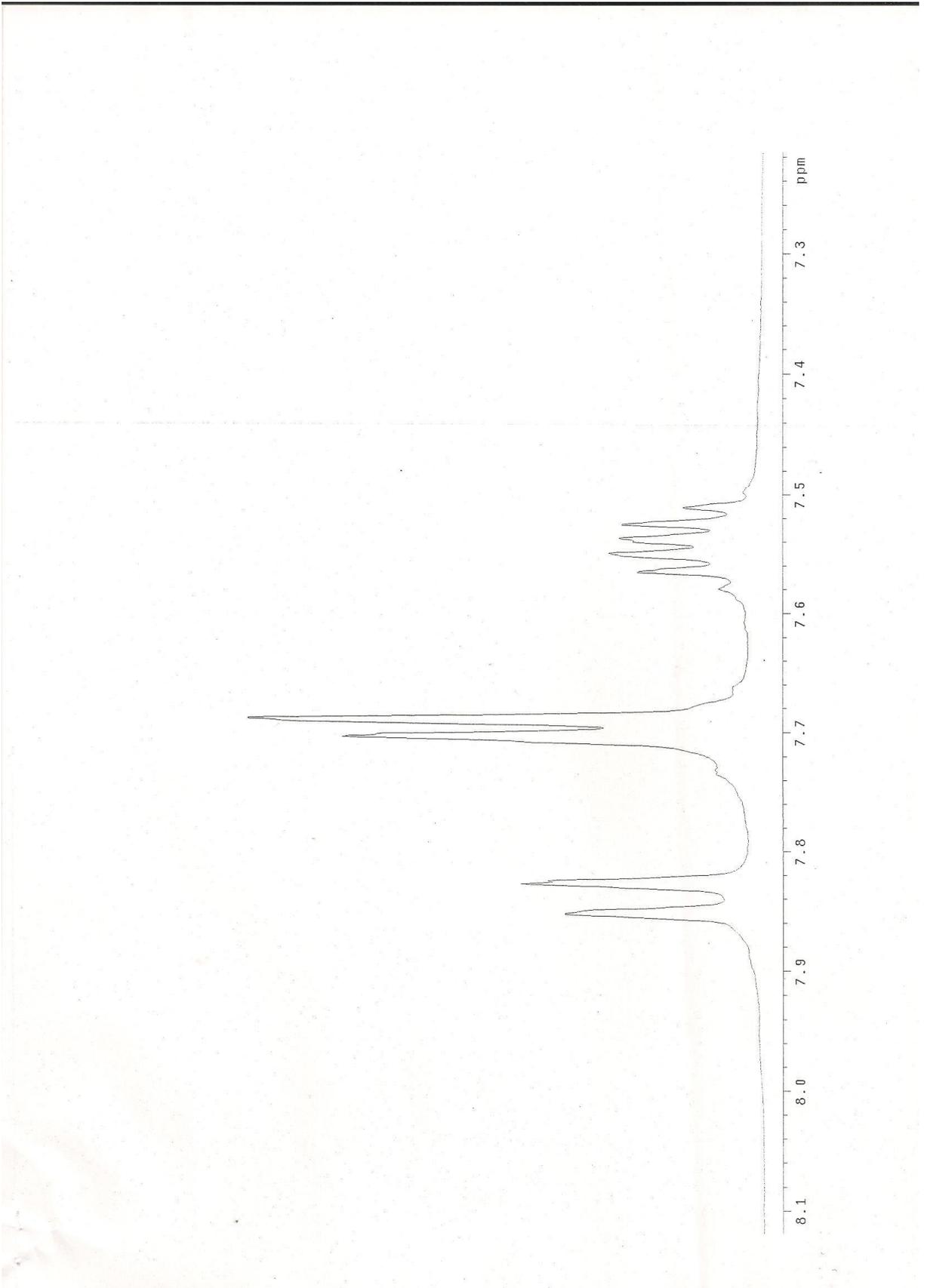
Analysis Info	Acquisition Date
Analysis Name	10/22/2013 10:54:07 AM
Method	Operator
Sample Name	BDAL@DE
Comment	micrOTOF-Q II

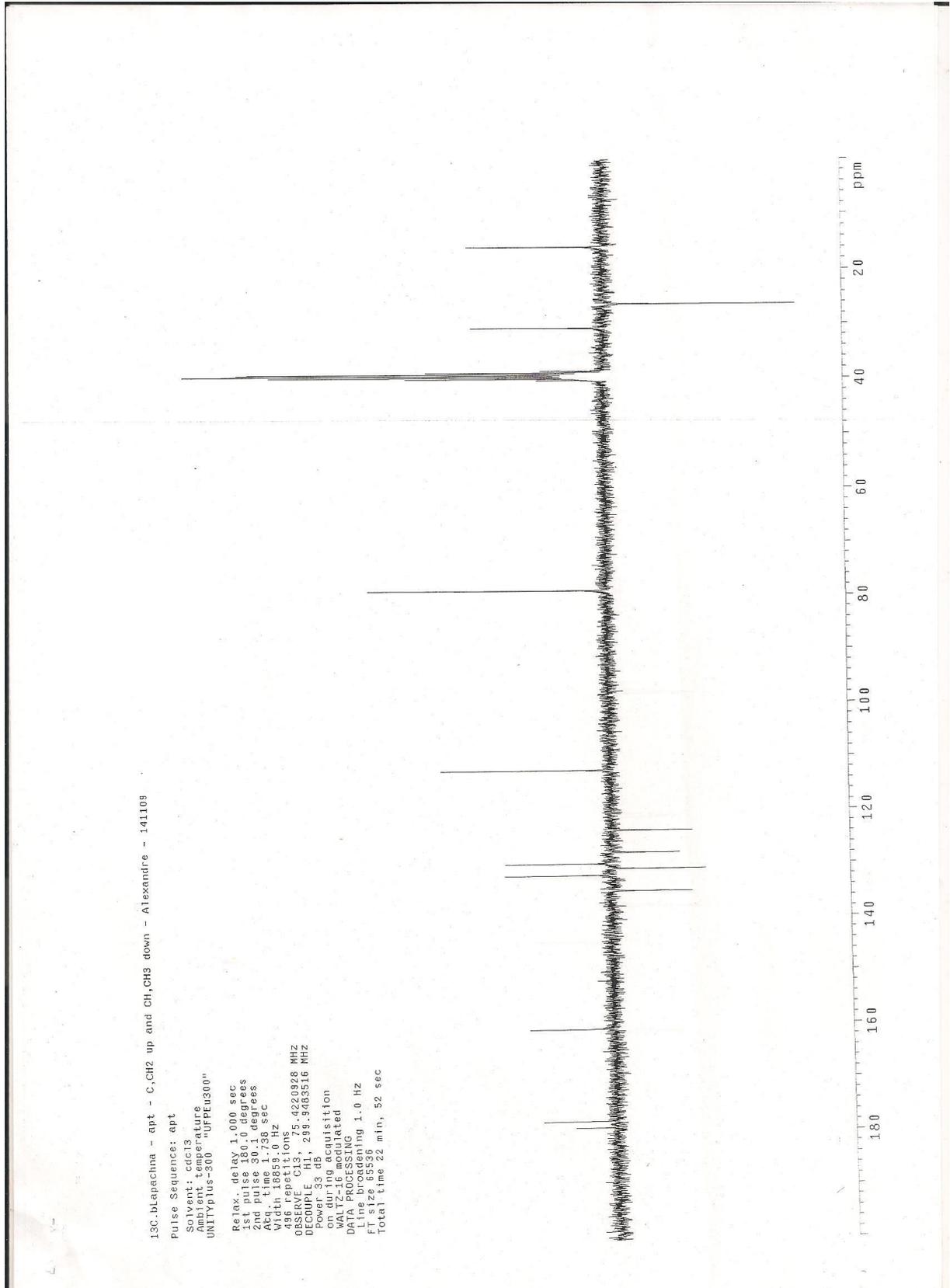
D:\Data\GIBSON\_ISLA\Beta lapachol\_Positivo.d  
Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Beta lapachol\_Positivo

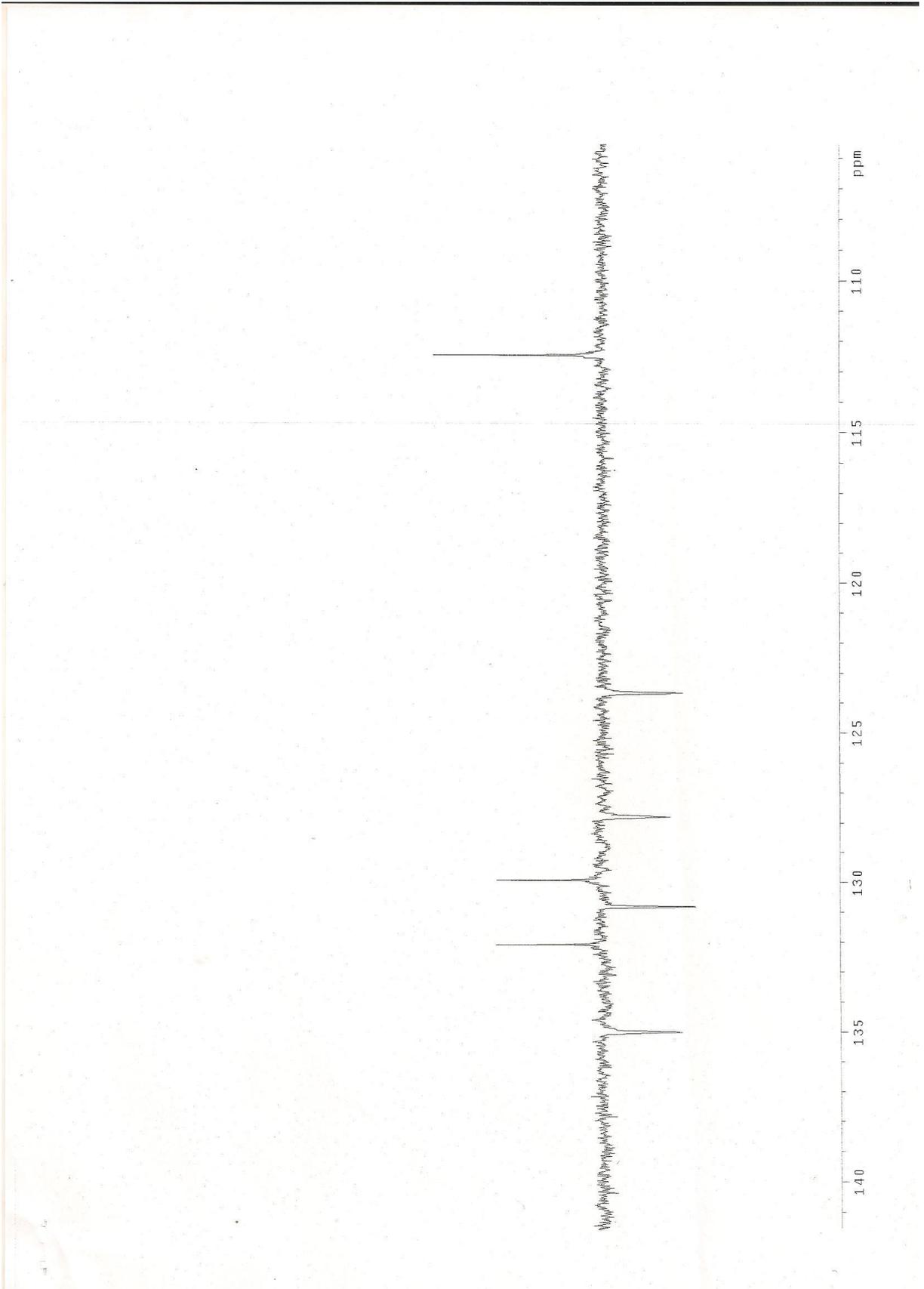


RMN<sup>1</sup>H



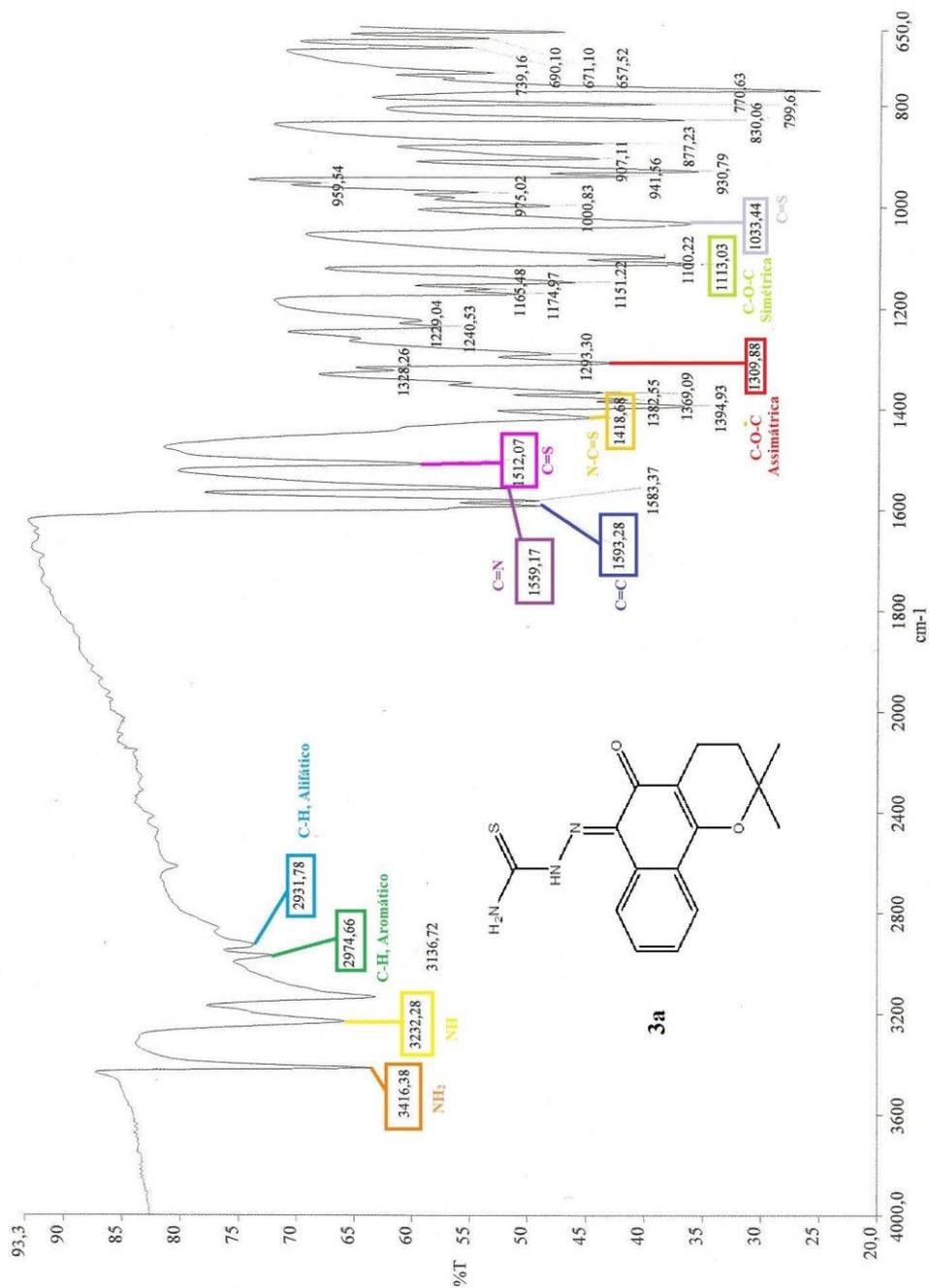


RMN<sup>13</sup>C



**Anexo 2 – Espectros derivado 3a:** (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida

**Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

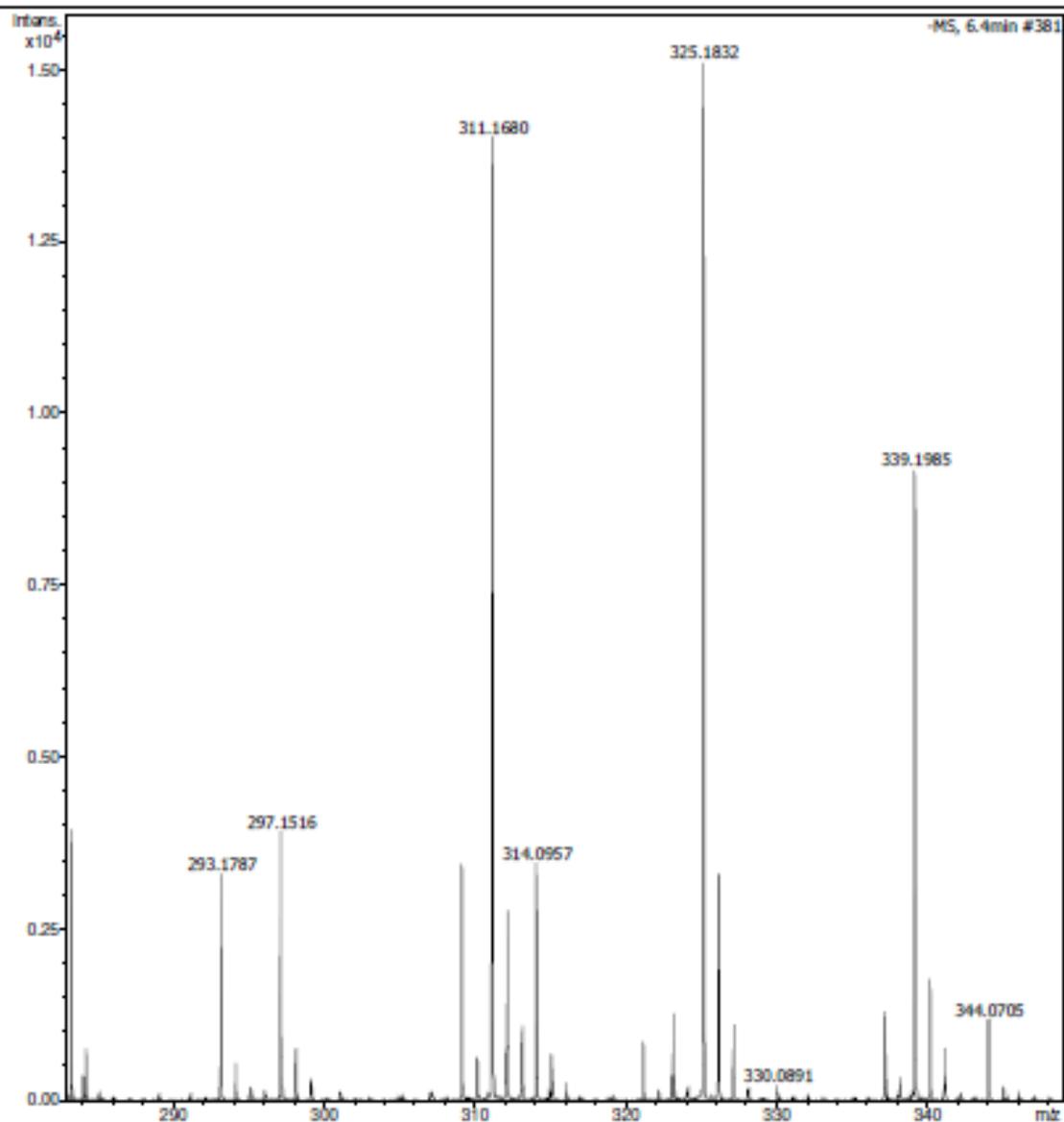
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-1\_NEG.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-1\_NEG  
Comment

Acquisition Date 2/12/2014 9:12:18 AM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

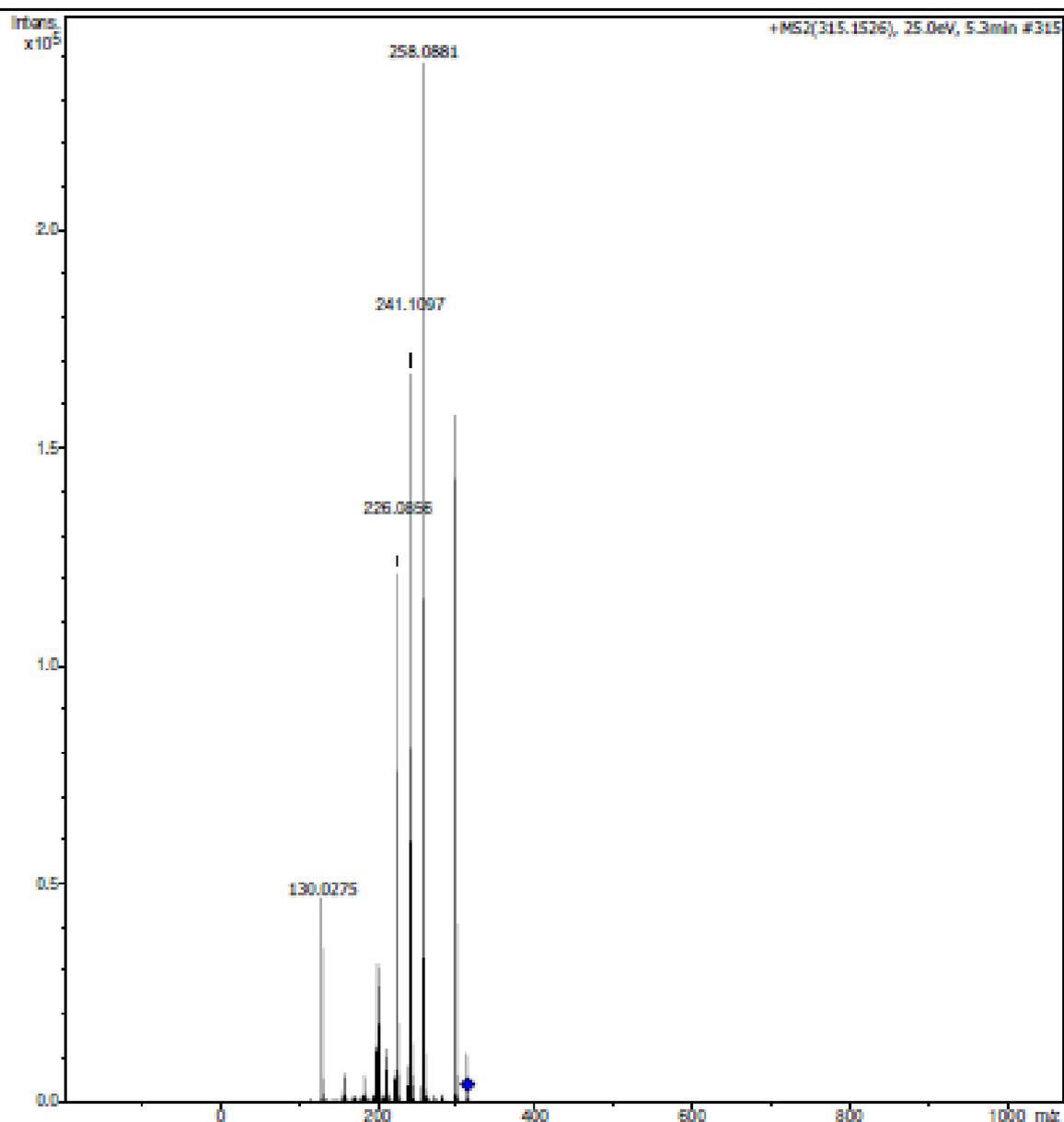
Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-1\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-1\_POS  
Comment

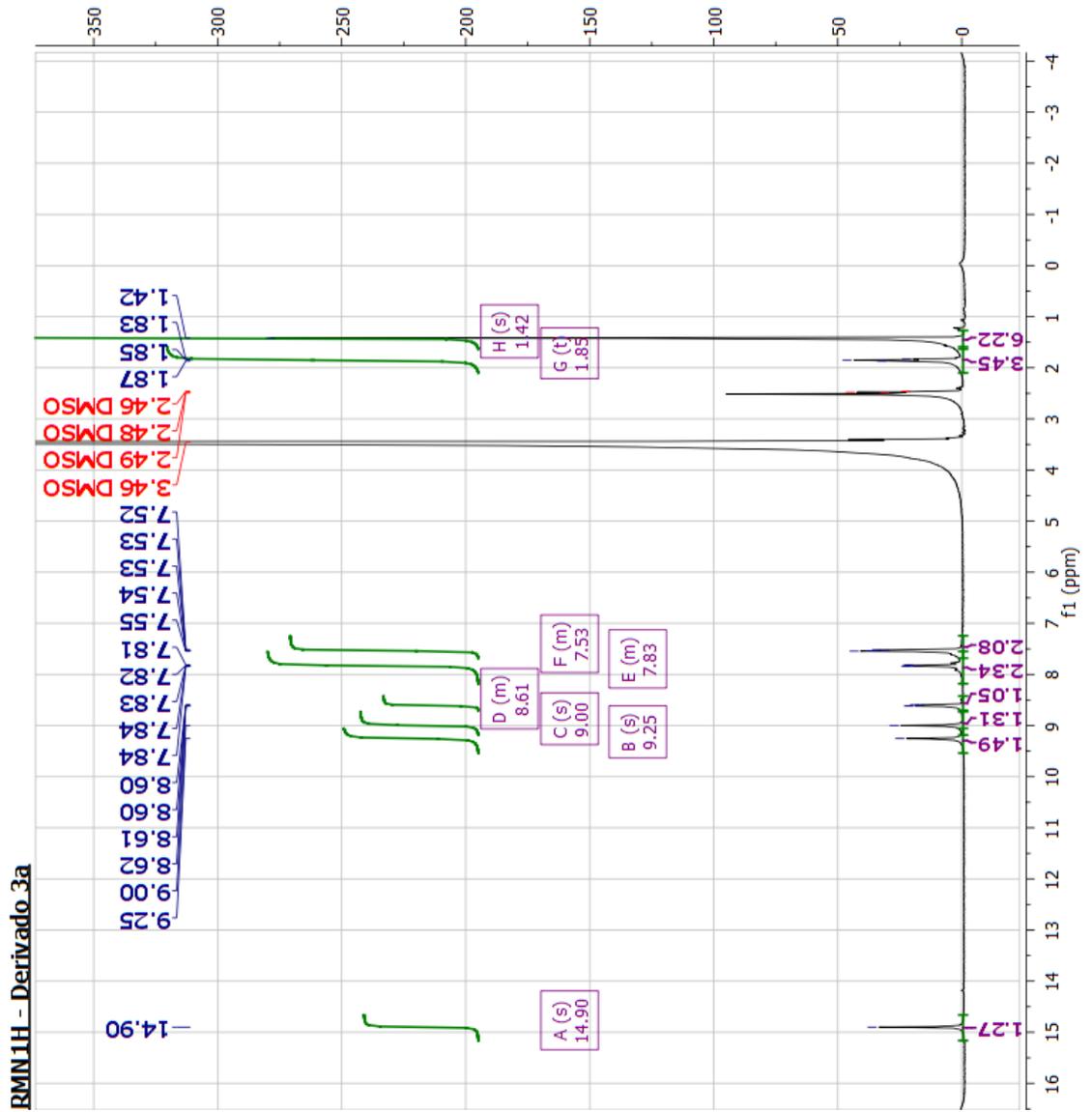
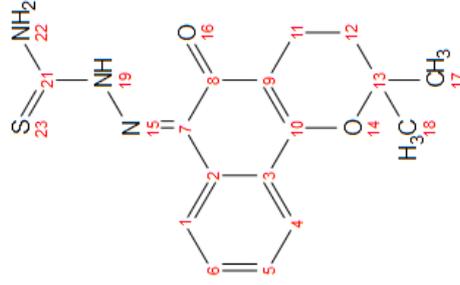
Acquisition Date 2/11/2014 5:15:26 PM

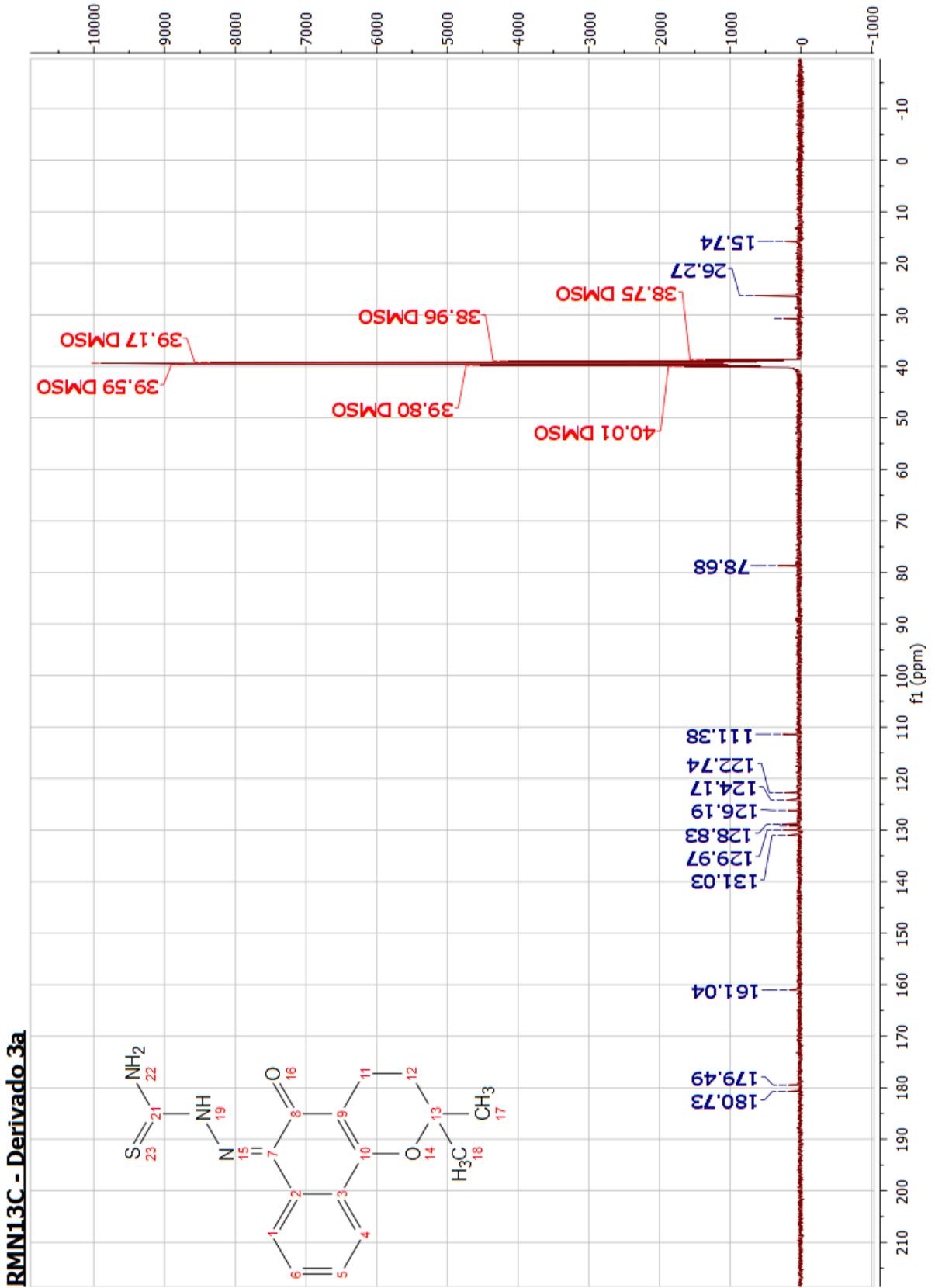
Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II

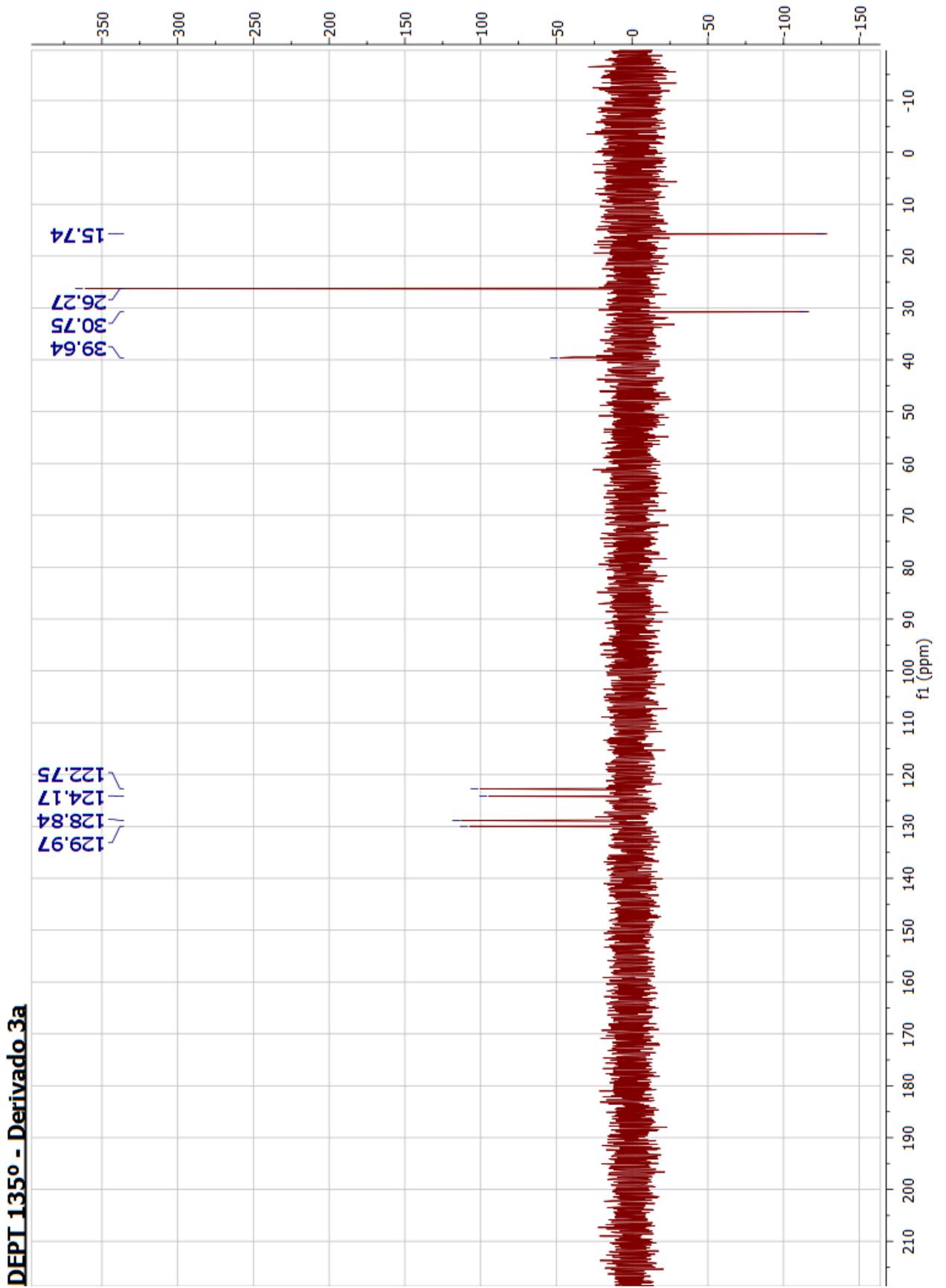


RMN<sup>1</sup>H

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ  
 14.90 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 9.00 (s, 1H),  
 8.70 – 8.42 (m, 1H), 8.18 – 7.55 (m,  
 2H), 7.68 – 7.24 (m, 2H), 1.85 (t, J = 6.7  
 Hz, 3H), 1.42 (s, 6H).

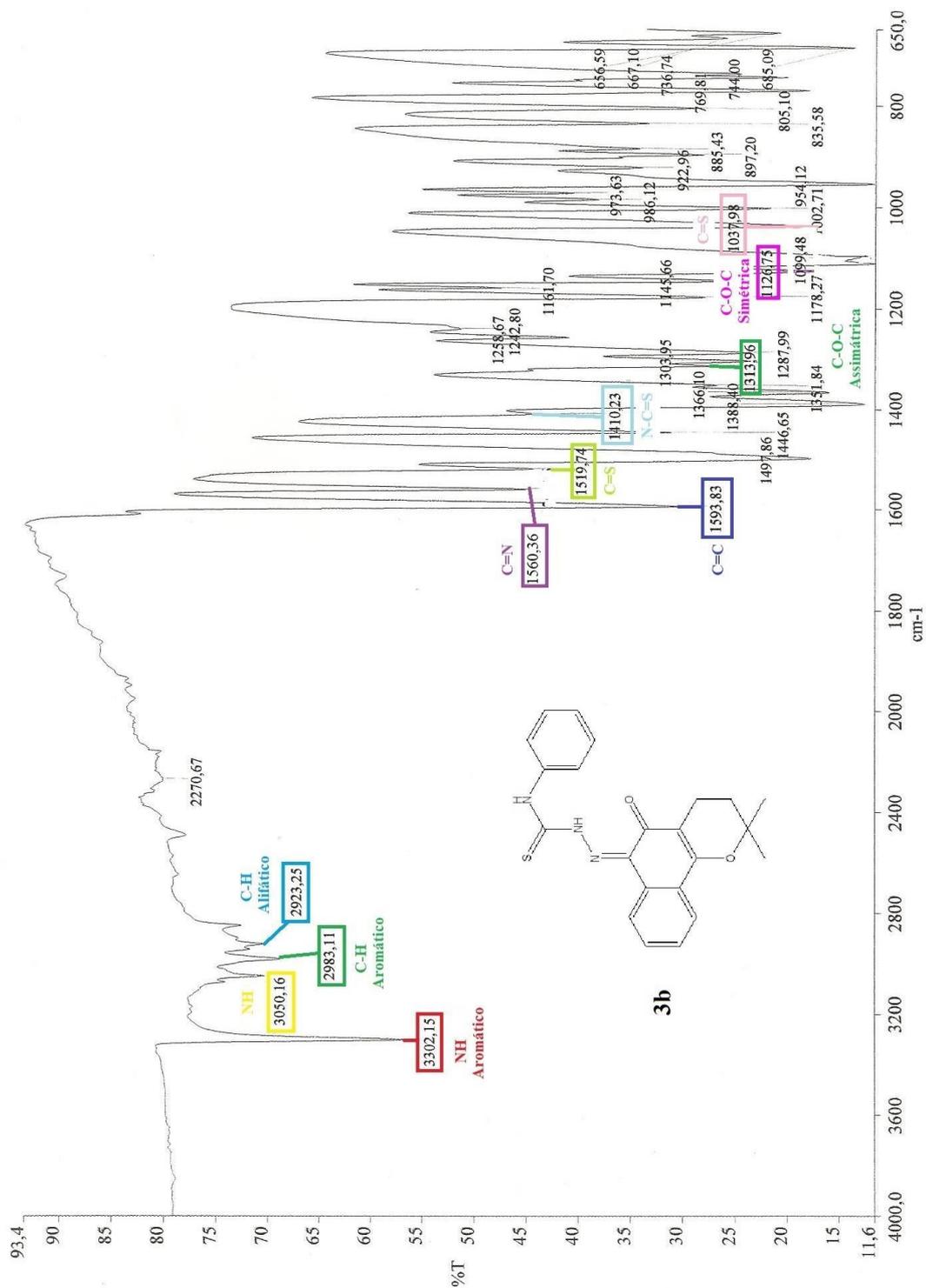


RMN<sup>13</sup>C



**Anexo 3 – Espectros derivado 3b: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



## Massa de Alta Resolução

## Generic Display Report

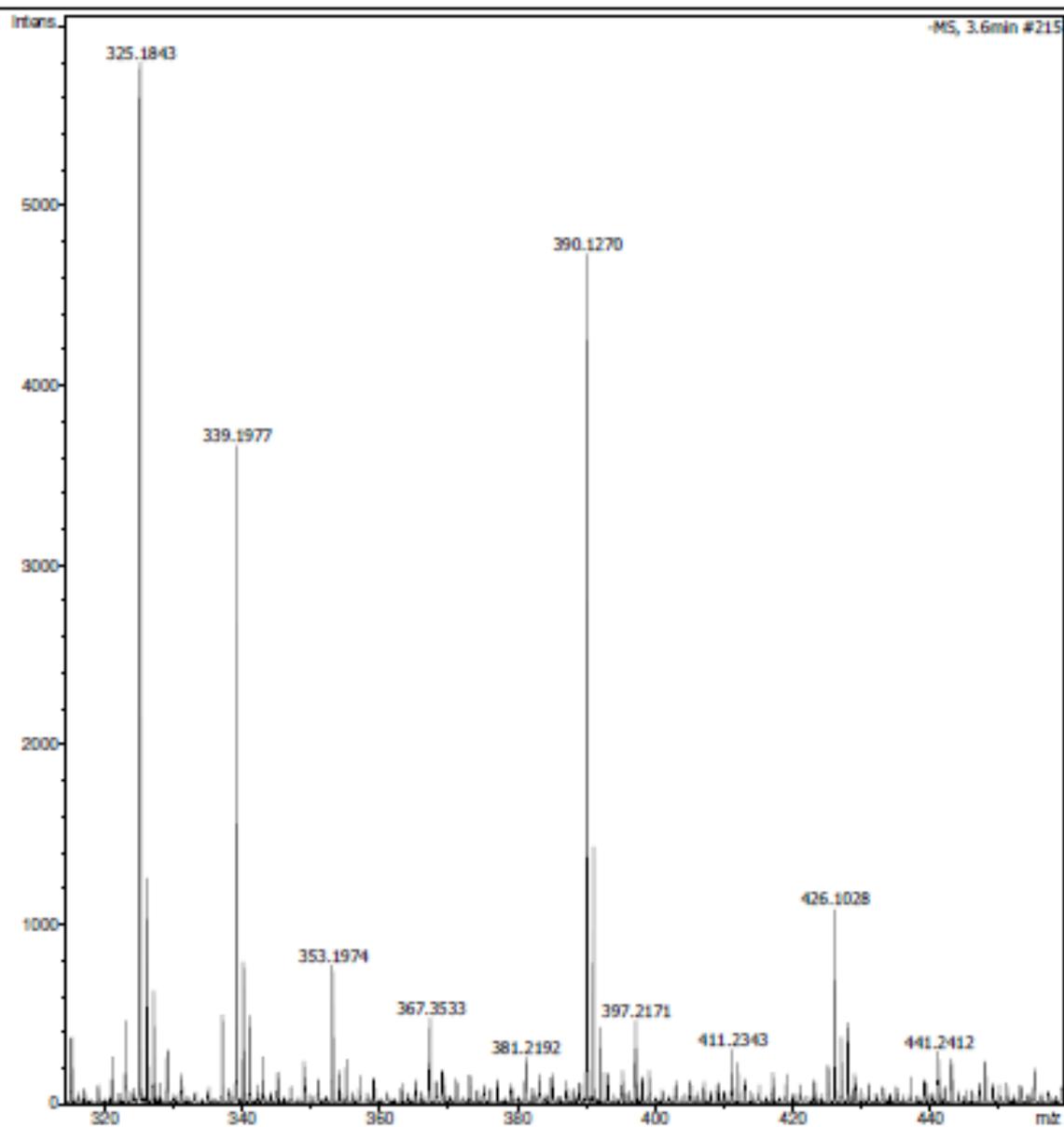
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-2\_NEG.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-2\_NEG  
Comment

Acquisition Date 2/12/2014 9:22:18 AM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

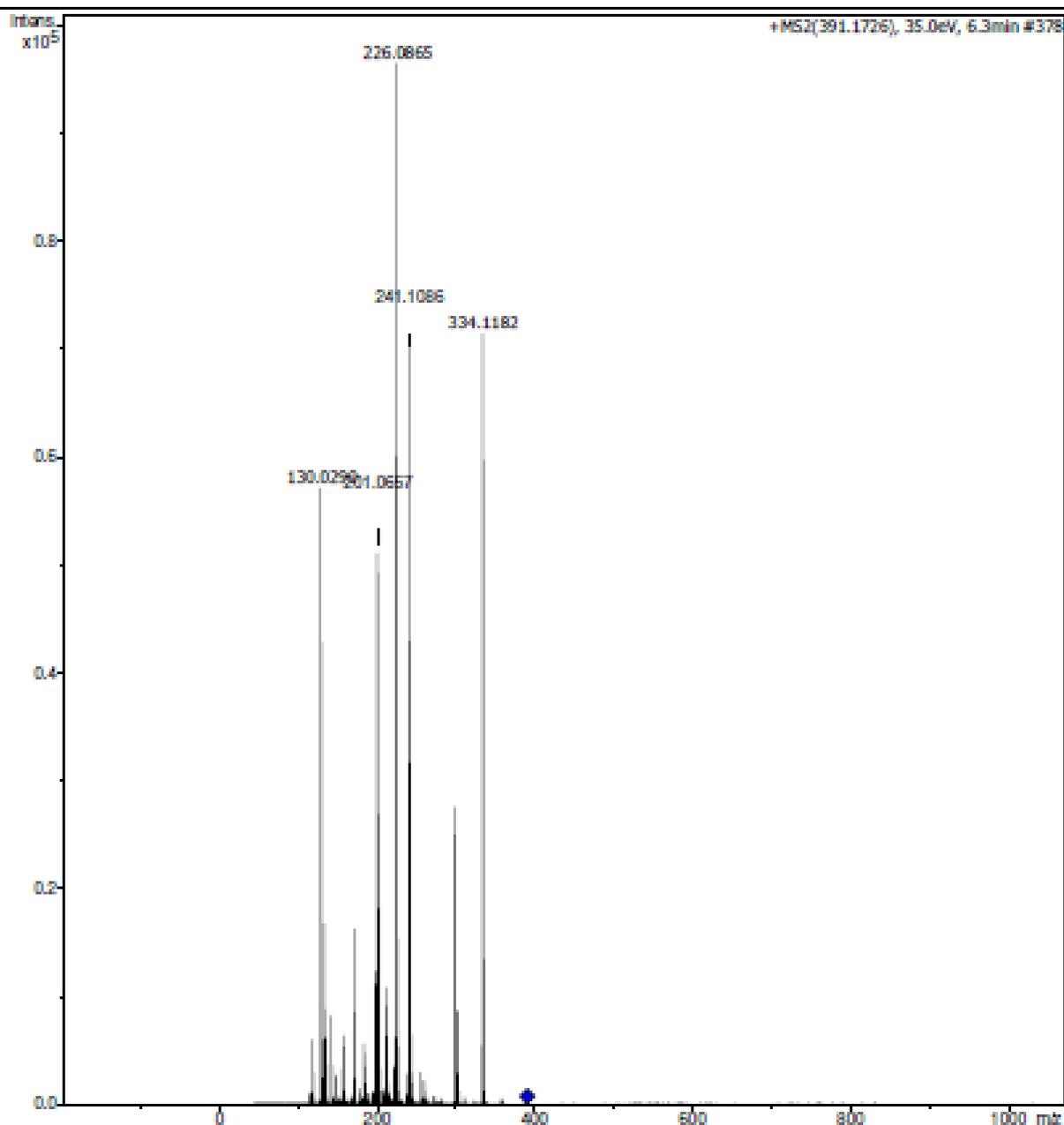
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

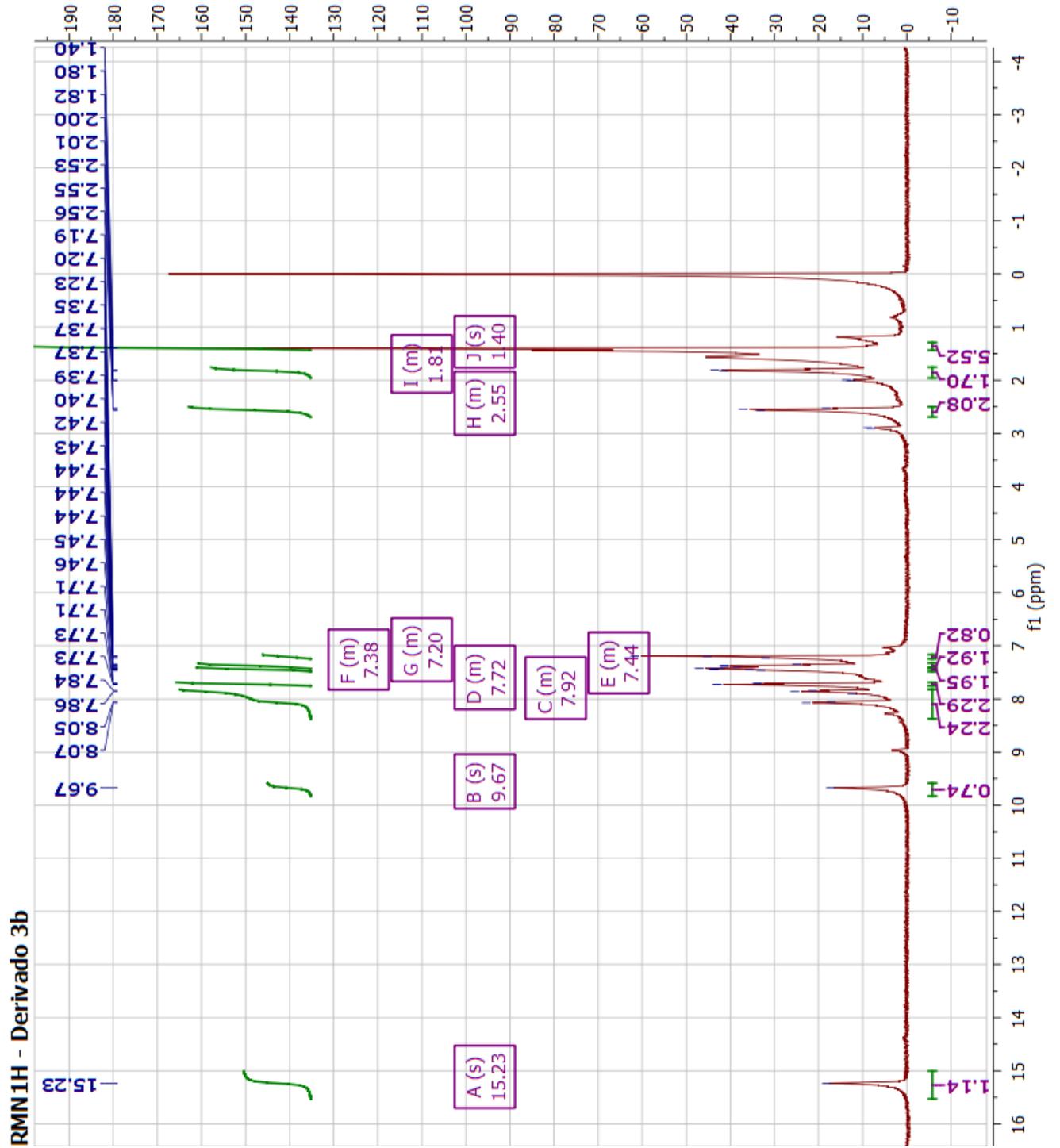
Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-2\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-2\_POS  
Comment

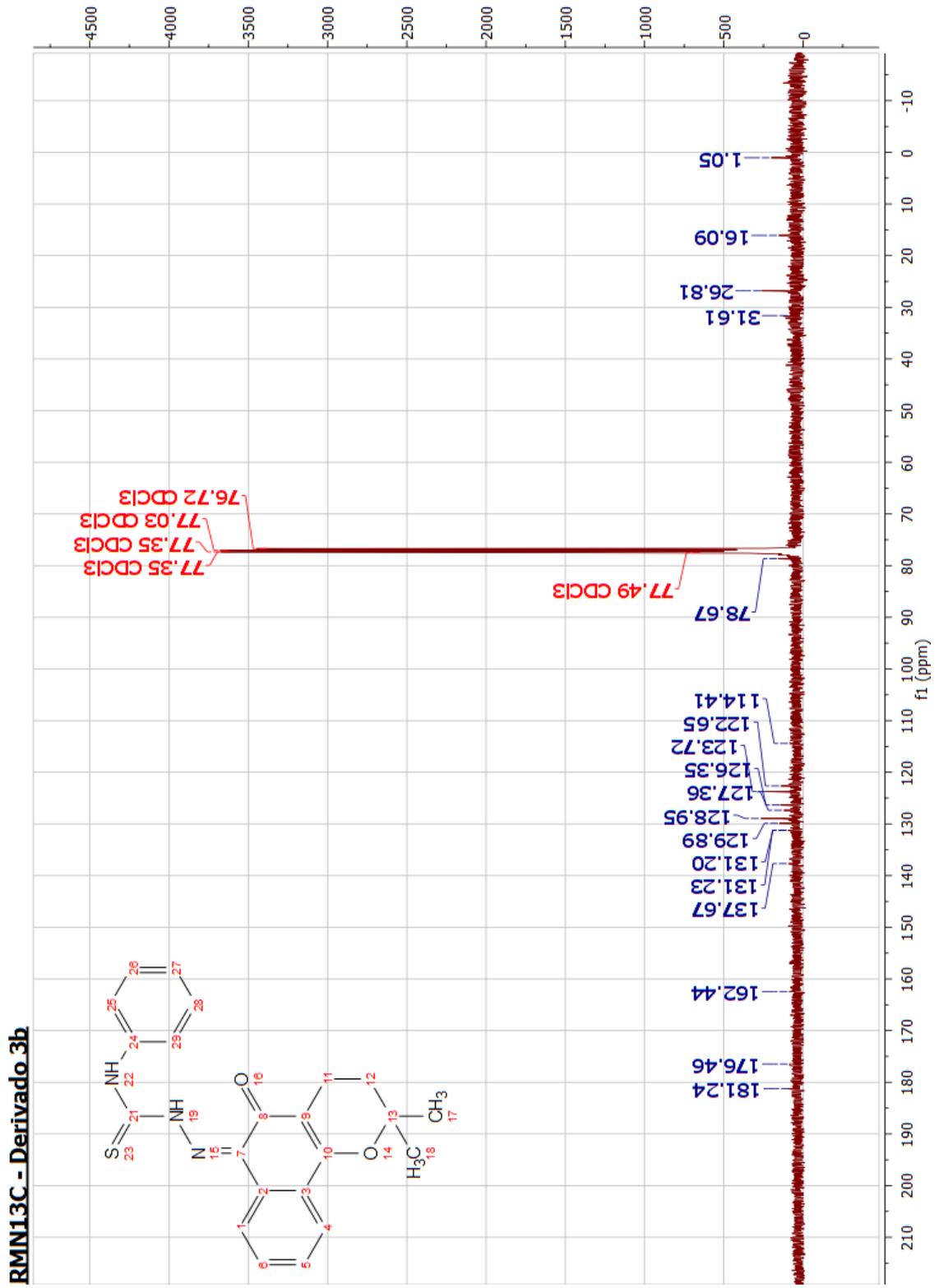
Acquisition Date 2/11/2014 5:06:53 PM

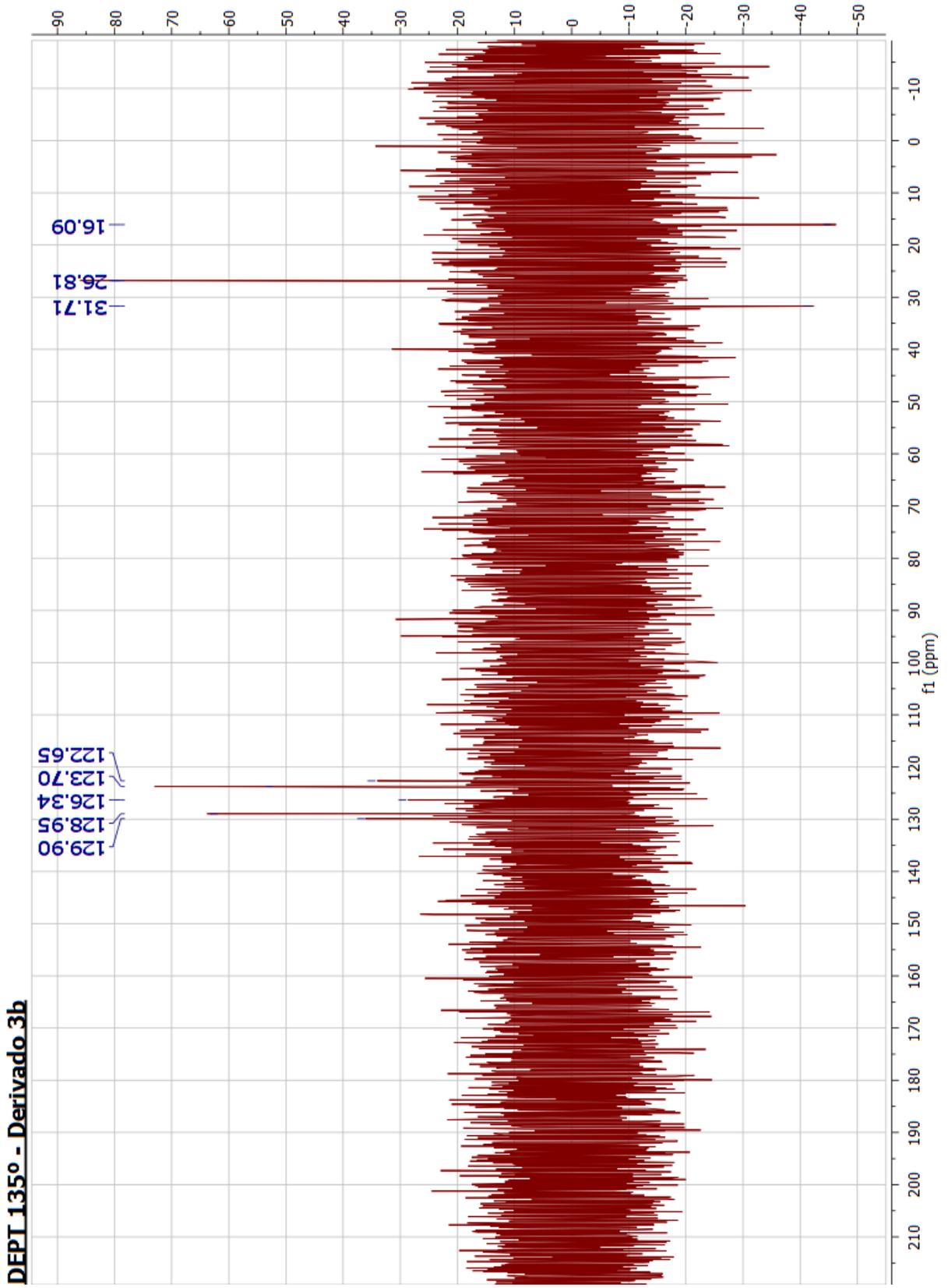
Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



RMN<sup>1</sup>H

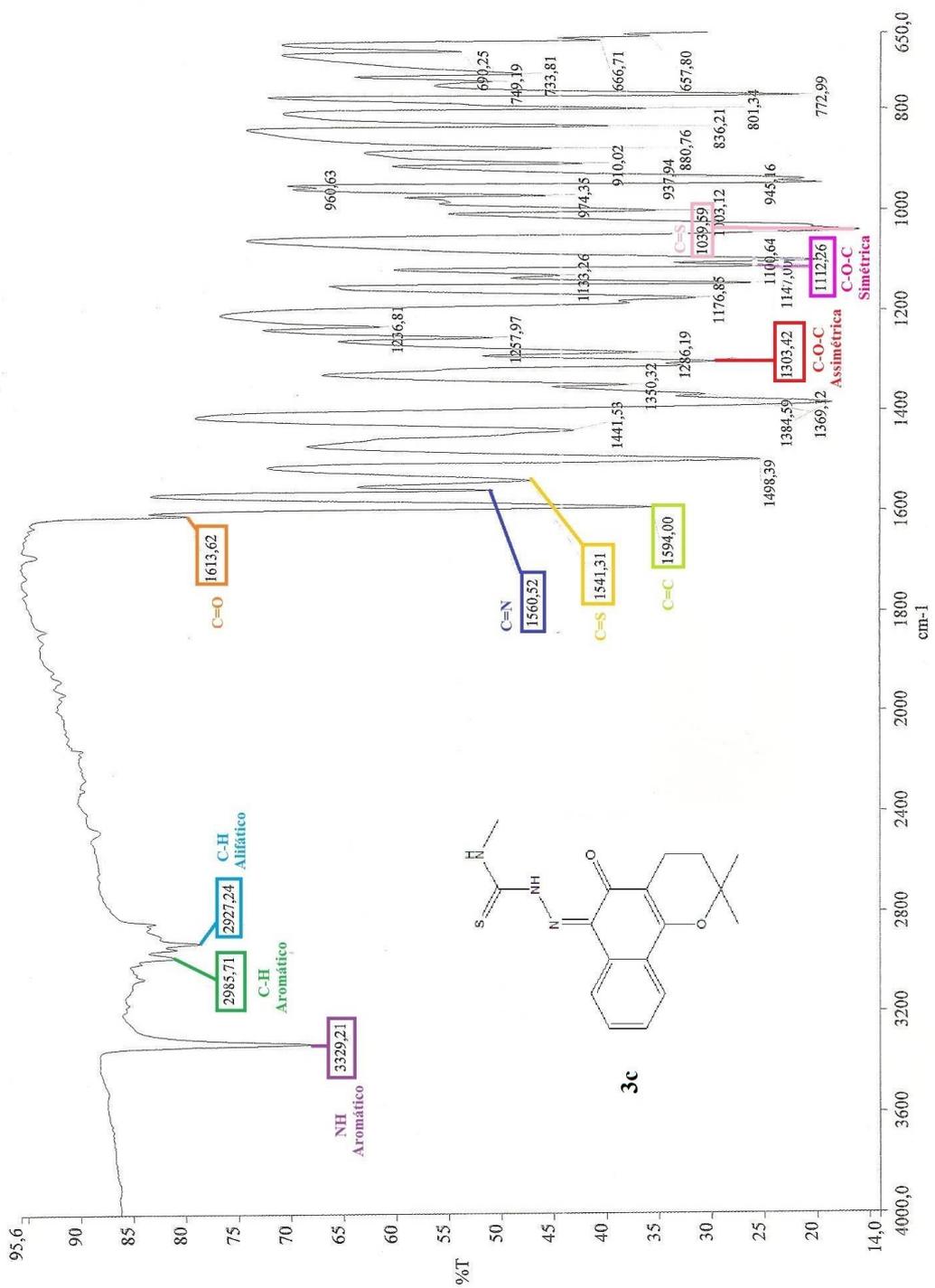


RMN<sup>13</sup>C



**Anexo 4 – Espectros derivado 3c: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)-N-metil-hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



# Massa de alta resolução

Formula Predictor Report - M0710\_4(2).lcd

Page 1 of 1

Data File: C:\LabSolutions\Data\Project1\Data File\M0710\_4(2).lcd

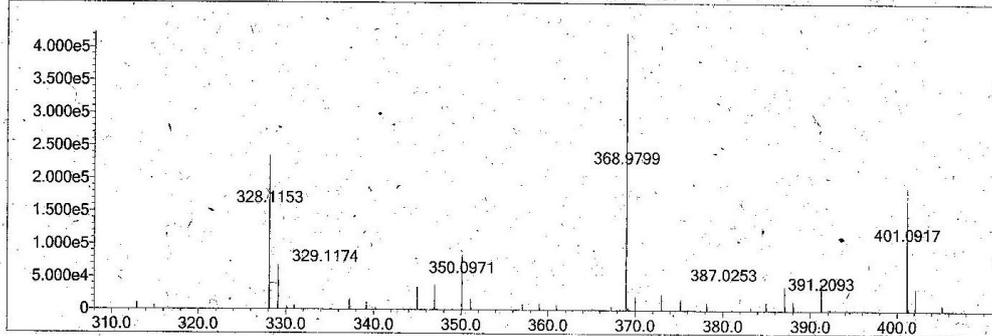
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	19	50	F	1	0	1	Se	2	0	1	H
C	4	17	50	S	2	1	1	Br	1	0	1	CH3COO
N	3	3	12	Cl	1	0	6	Te	2	0	0	H2O
O	2	2	10	Fe	2	0	5	I	3	0	1	

Error Margin (ppm): 100  
 HC Ratio: 0.0 - 200.0  
 Max Isotopes: all  
 MSn Iso RI (%): 75.00

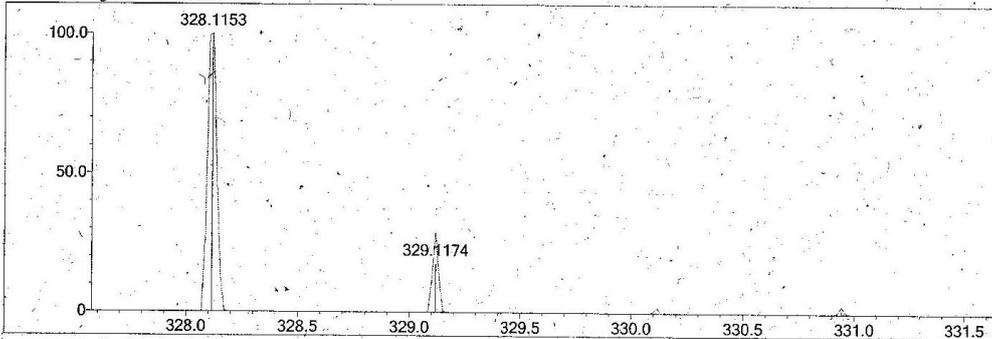
DBE Range: 0.0 - 200.0  
 Apply N Rule: yes  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both  
 Use MSn Info: no  
 Isotope Res: 10000  
 Max Results: 5

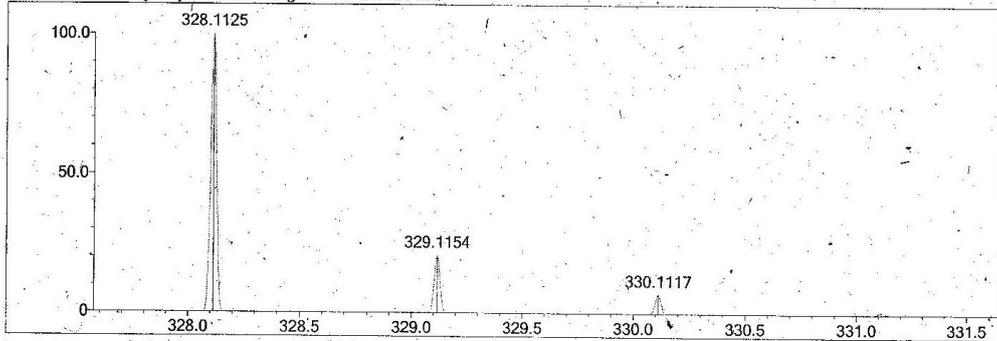
Event#: 2 MS(E-) Ret. Time : 0.144 -> 1.074 - 2.790 -> 3.621 Scan#: 20 -> 136 - 350 -> 454



Measured region for 328.1153 m/z



C17 H19 N3 O2 S [M-H]- : Predicted region for 328.1125 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	38.40	C17 H19 N3 O2 S	[M-H]-	328.1153	328.1125	2.8	8.53	70.20	10.0

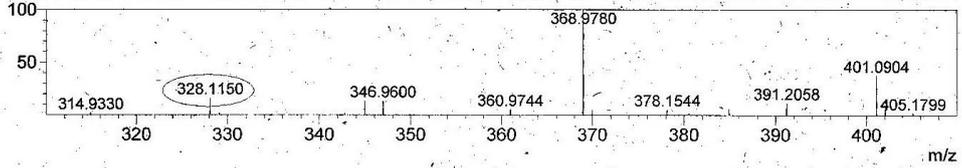
**ESPECTRO DE MASSAS (MODO NEGATIVO)**

MS Spectrum Graph

Peak#:1 Ret.Time:Averaged 0.316-0.361(Scan#:29-33)

BG Mode:Calc 0.158<->1.129(15<->101)

Mass Peaks:14 Base Peak:368.9780 MS Stage:MS Polarity:Neg Segment1 - Event1 Precursor:--- Cutoff: 1



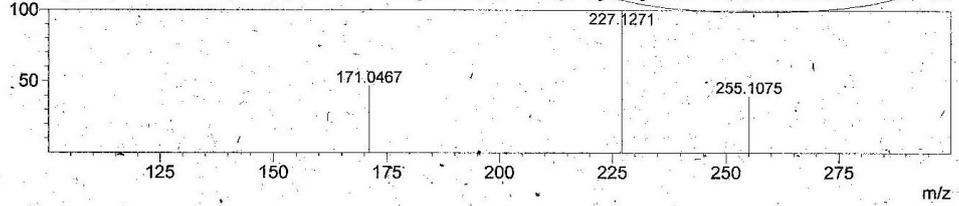
**ESPECTRO DE MASSAS (MS2)**

MS Spectrum Graph

Peak#:1 Ret.Time:Averaged 0.587-0.632(Scan#:54-58)

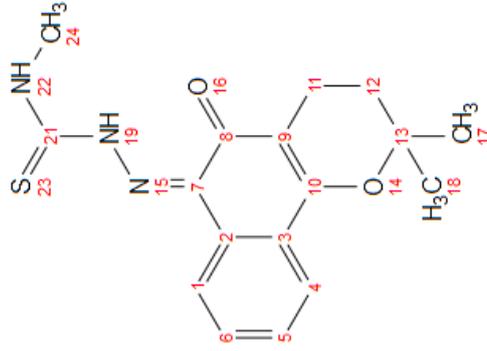
BG Mode:Calc 0.361<->0.790(34<->72)

Mass Peaks:4 Base Peak:227.13(10453) MS Stage:MS/MS Polarity:Neg Segment1 - Event2 Precursor:328.12 Cu

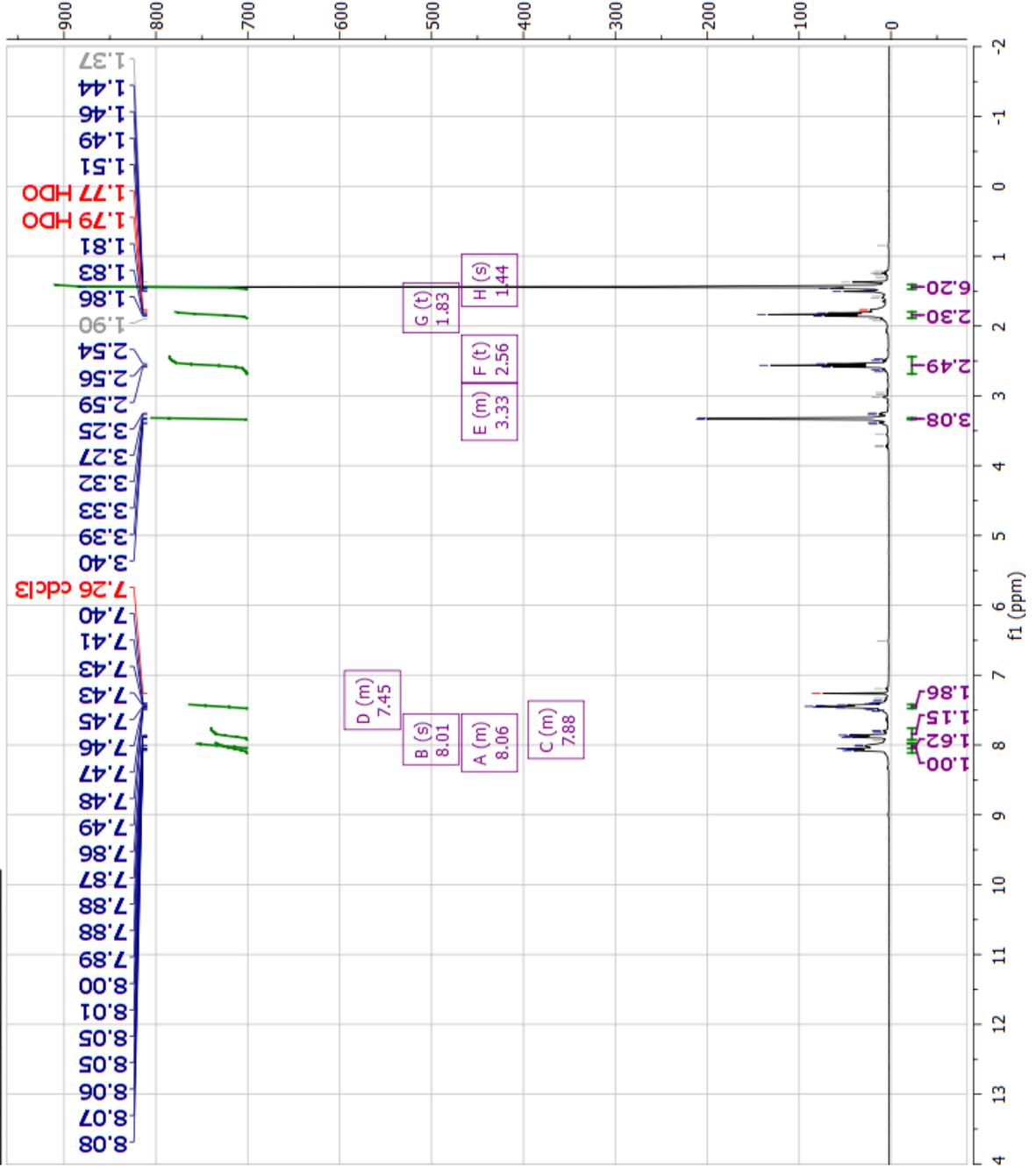


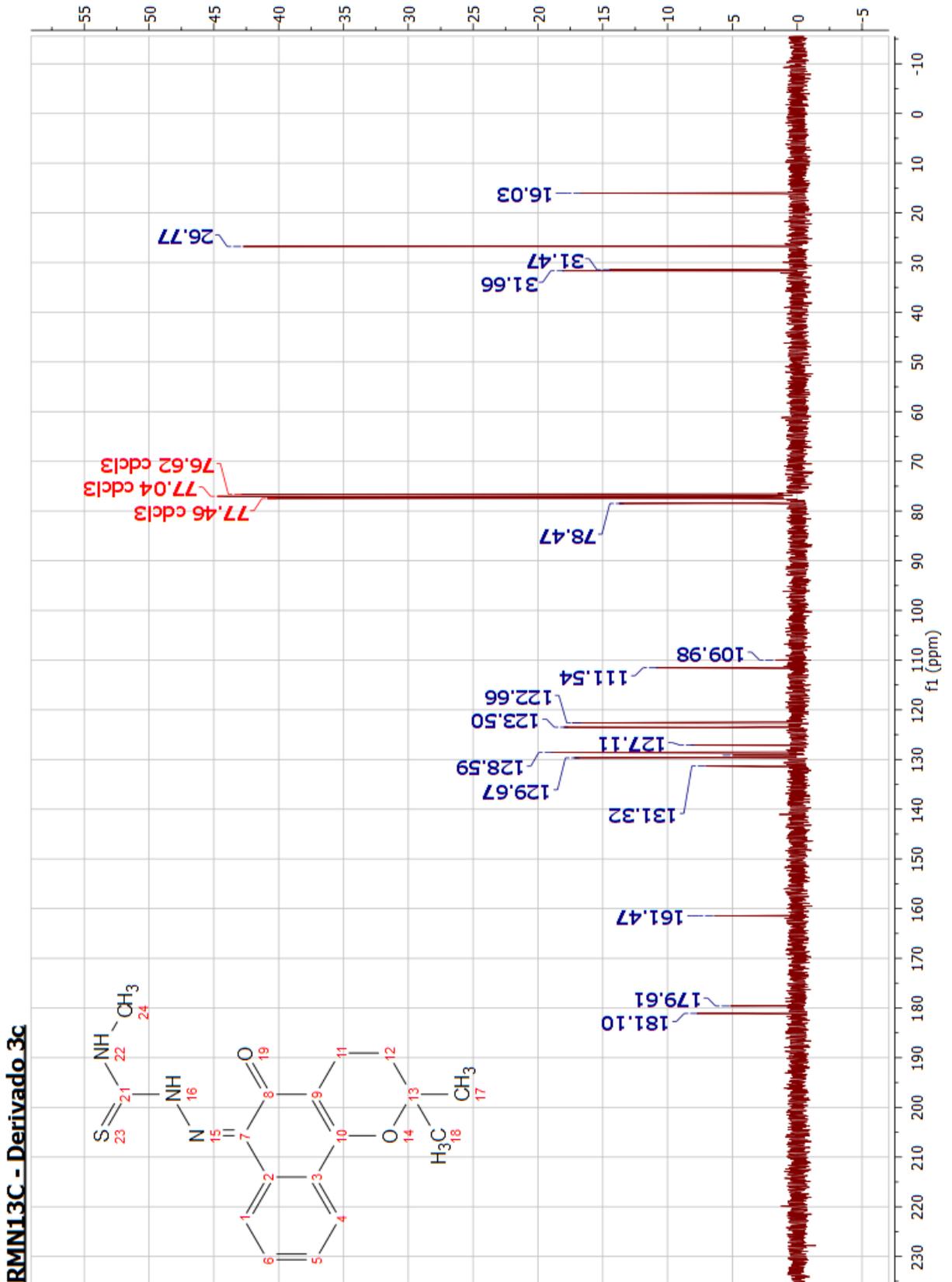
RMN<sup>1</sup>H

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ  
 8.11 – 7.97 (m, 1H), 8.01 (s, 2H), 7.92 – 7.76 (m, 1H), 7.48 – 7.42 (m, 2H), 3.34 – 3.32 (m, 3H), 2.56 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.83 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).



RMN<sup>1</sup>H - Derivado 3c



RMN<sup>13</sup>C

Prof. Alexandre Goes  
Amcstra BV-7  
Solidacao N. MO610-9  
10.06.1014 UFFE

Sample Name:  
joana.amcstra  
Data Collected on:  
Agilent300-vnmrs300  
Archive directory:

Sample directory:  
F1AF1E: MO610\_9.dept

Pulse Sequence: DEPT  
Solvent: dmsc  
Data collected on: Jun 10 2014

Operator: vnmr1

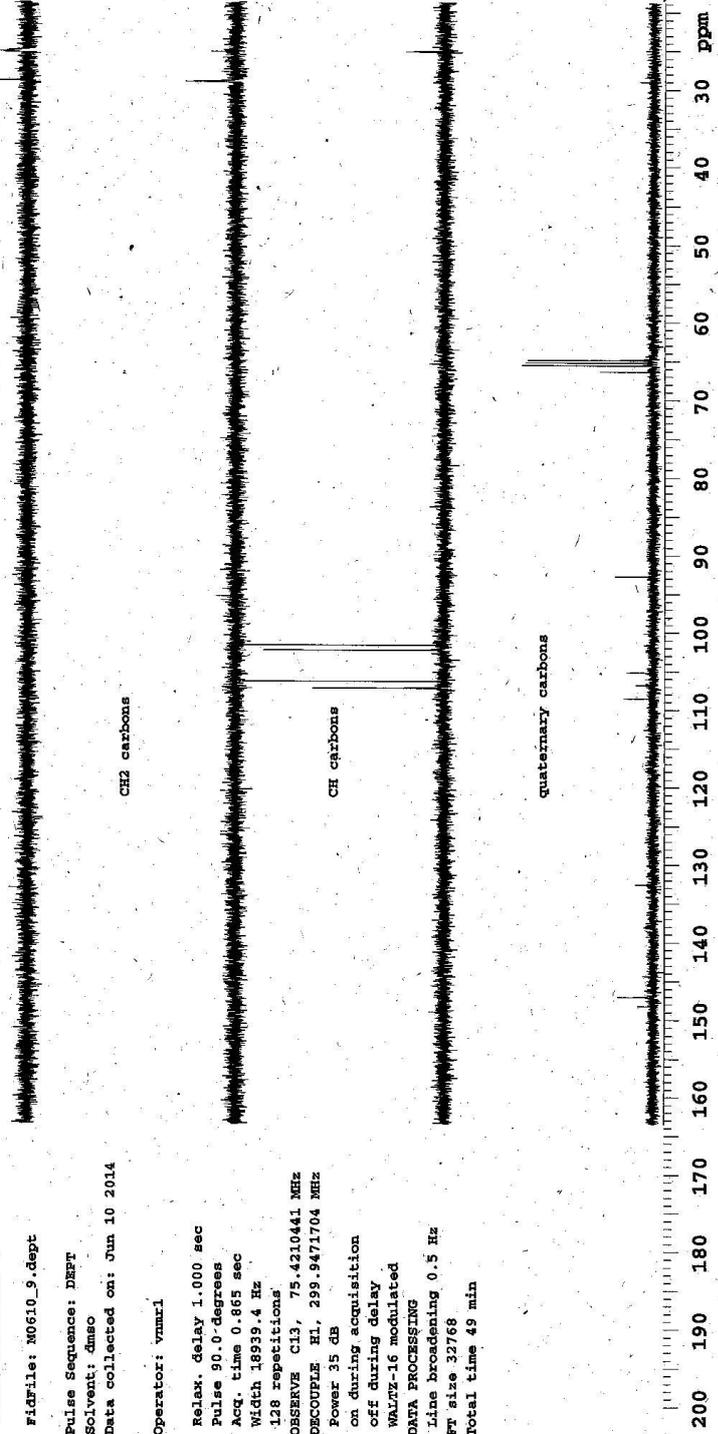
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 90.0 degrees  
Acq. time 0.865 sec  
Width 18939.4 Hz  
128 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4210441 MHz  
DECOUPLE H1, 299.9471704 MHz  
Power 35 dB  
on during acquisition  
off during delay  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.5 Hz  
F1 size 32768  
Total time 49 min

CH3 carbons

CH2 carbons

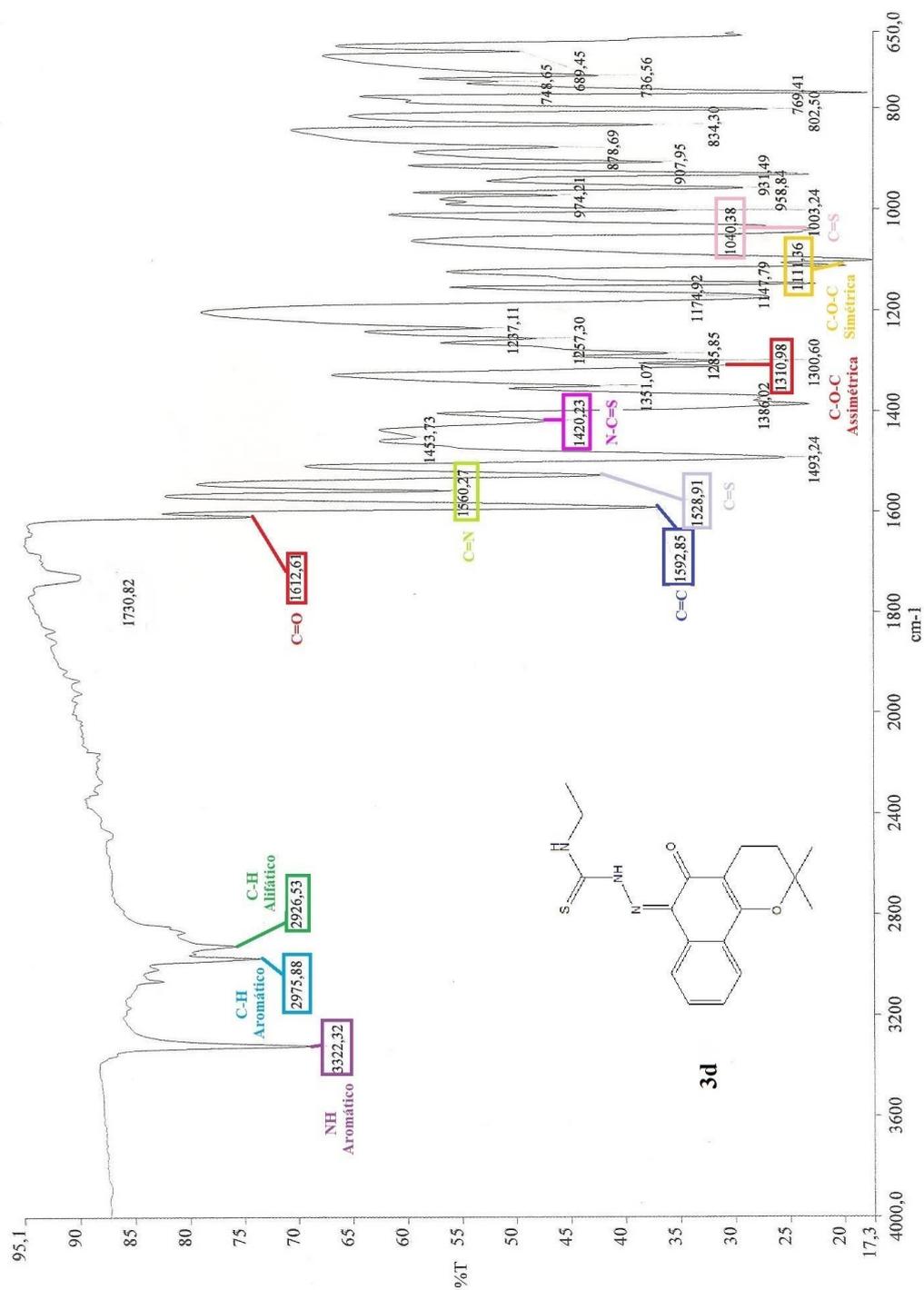
CH carbons

quaternary carbons



**Anexo 5 – Espectros do derivado 3d: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-etil-hidrazina-carbotioamida**

**6.1.1. Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

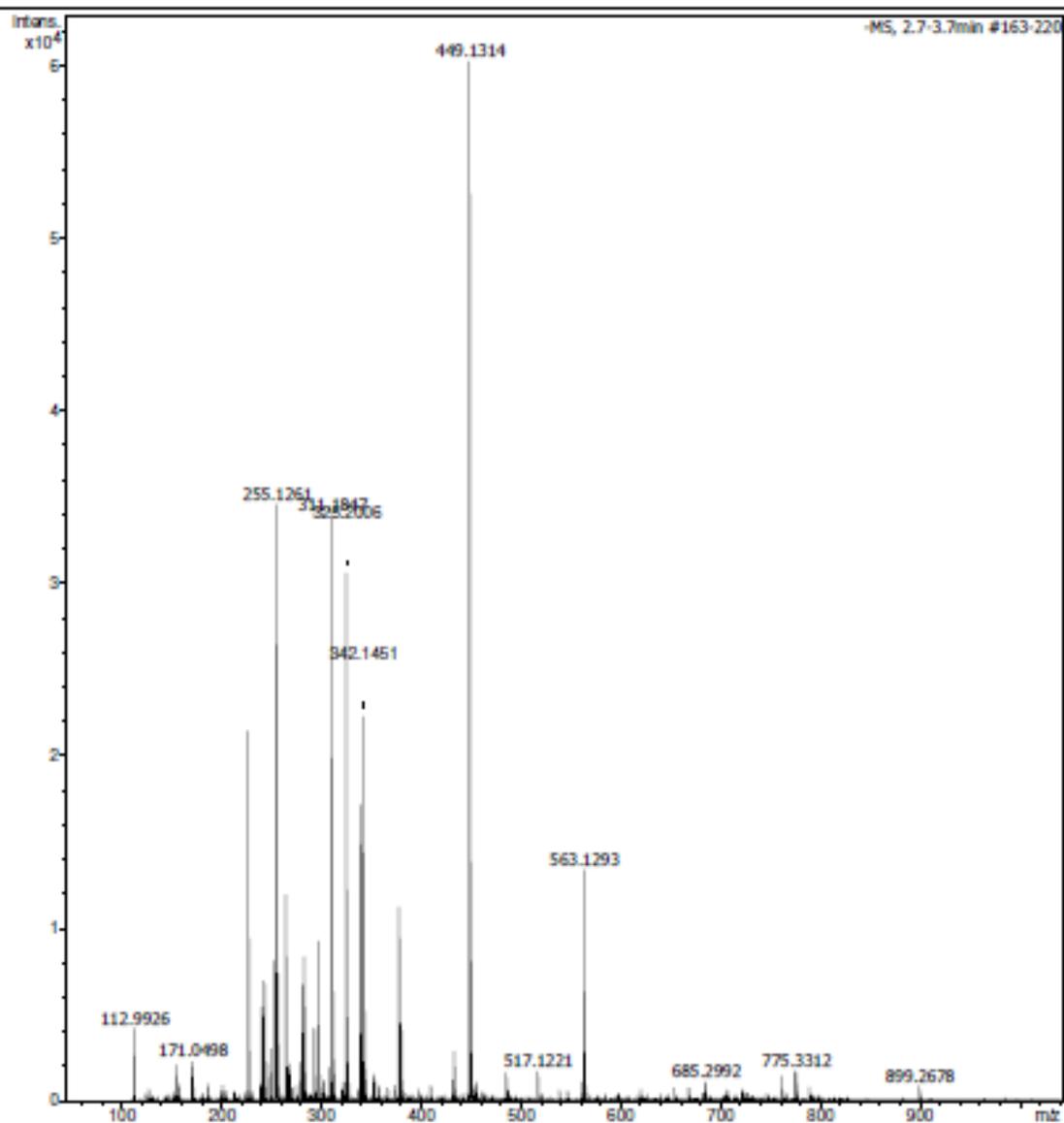
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV - 8\_NEG.d  
Method Tuna\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV - 8\_NEG  
Comment

Acquisition Date 3/12/2014 4:27:50 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

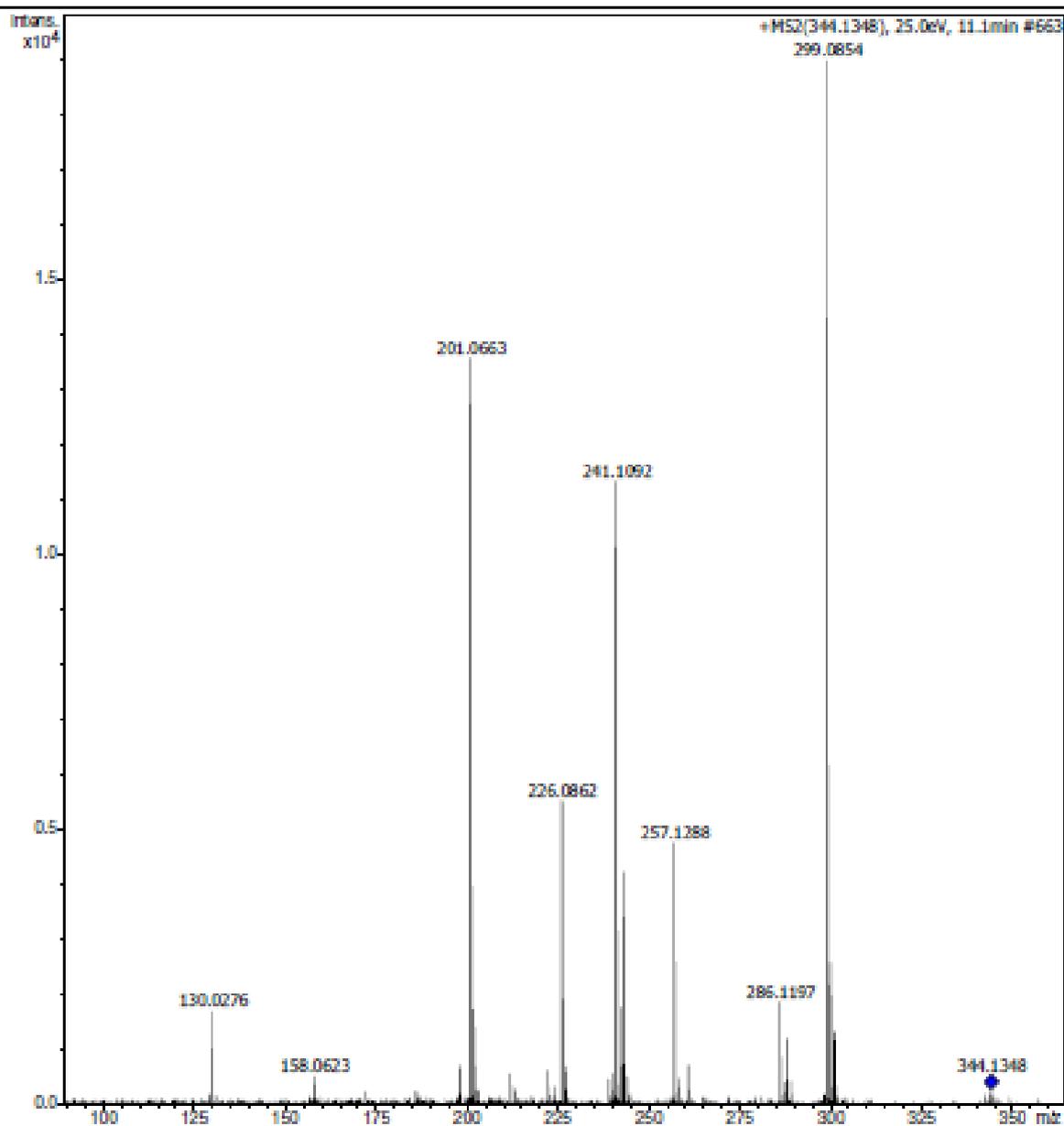
Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV - 8\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV - 8\_POS  
Comment

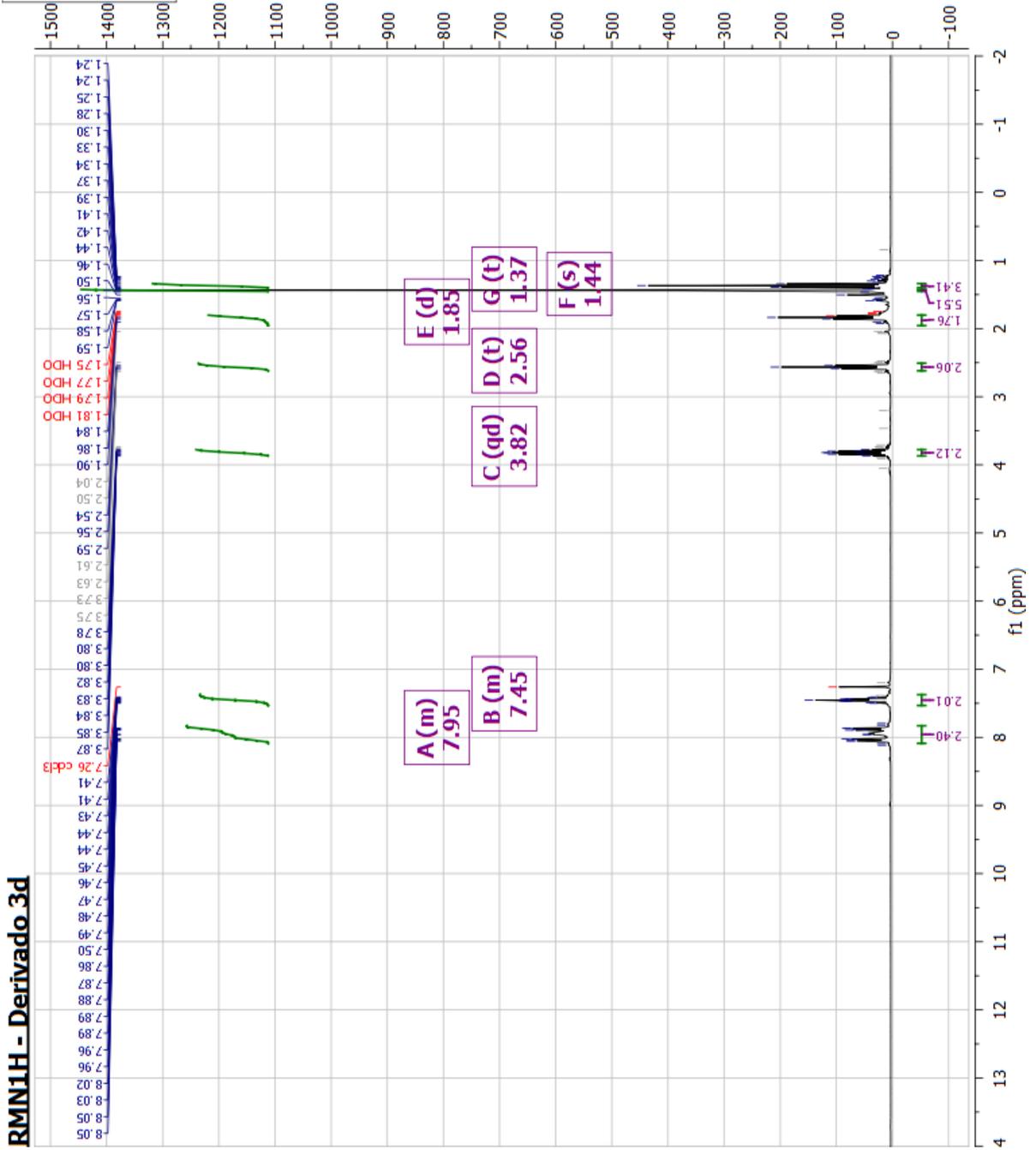
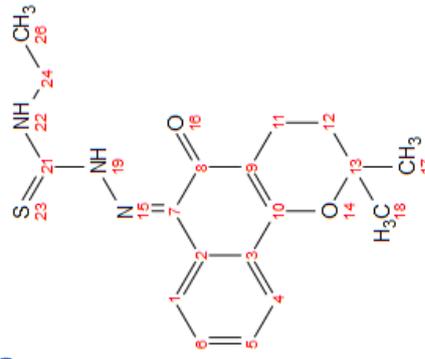
Acquisition Date 3/12/2014 2:36:33 PM

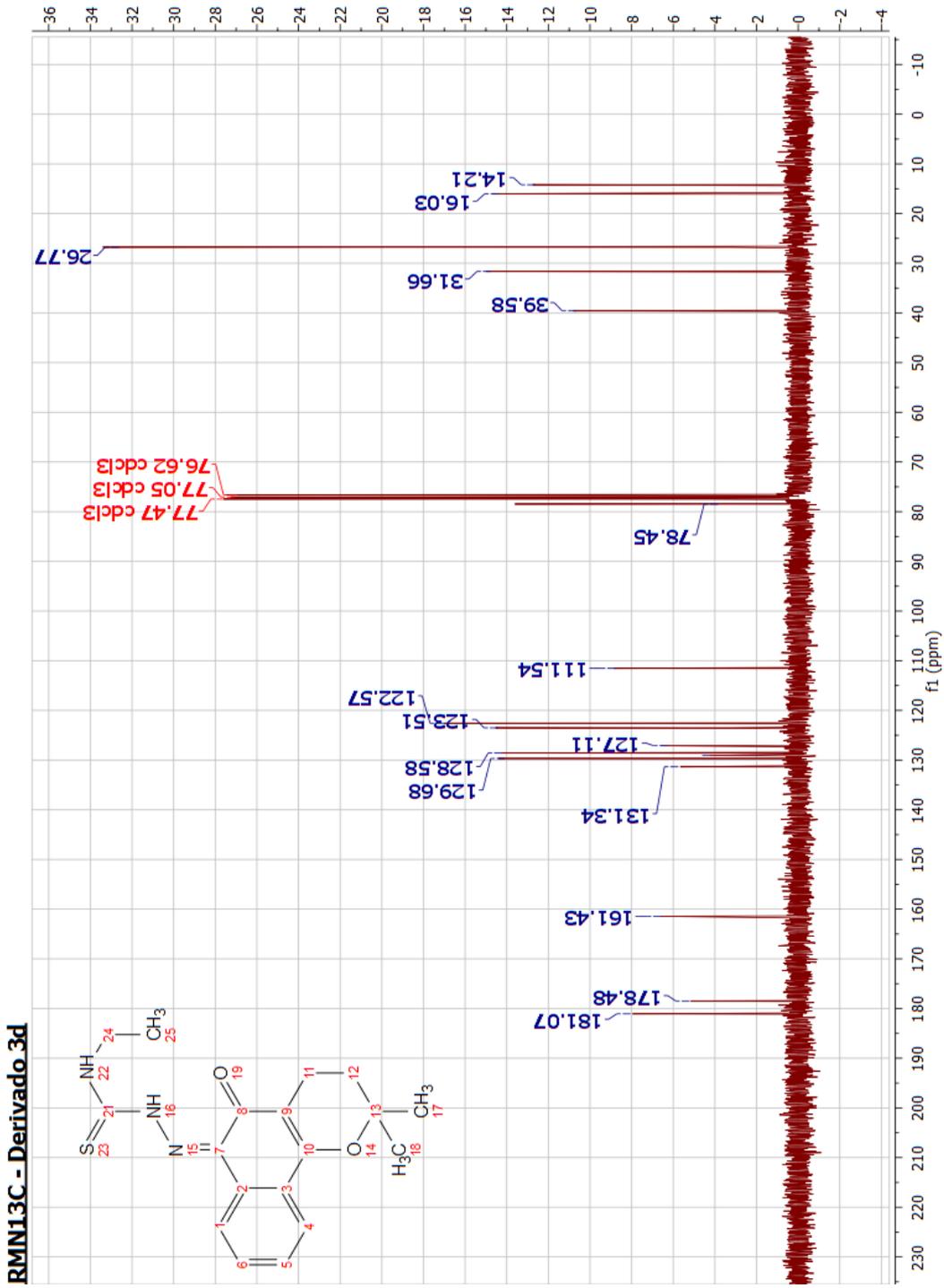
Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



RMN<sup>1</sup>H

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ  
 8.09 – 7.83 (m, 2H), 7.53 – 7.37 (m,  
 2H), 3.82 (qd, J = 7.2, 5.5 Hz, 2H), 2.56  
 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.85 (d, J = 6.6 Hz,  
 2H), 1.44 (s, 6H), 1.37 (t, J = 7.3 Hz,  
 3H).



RMN<sup>13</sup>C

Prof. Alexandre Goes  
Amostra EV-8  
Solicitacao N. M0610-10-  
10.06.1014 UFPE

Sample Name:  
joana\_amostra  
Data Collected on:  
Agilent300-vnmr300  
Archive directory:

Sample directory:

Fidfile: M0610\_10.dept

Pulse Sequence: DEPT

Solvent: dmsc

Data collected on: Jun 10 2014

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 90.0 degrees  
Acq. time 0.865 sec  
Width 18939.4-Hz  
128 repetitions

OBSERVE C13, 75.4210441 MHz  
DECOUPLE H1, 299.9471704 MHz  
Power 35 dB  
on during acquisition  
off during delay  
WALTZ-16 modulated.  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.5 Hz  
FT size 32768  
Total time 49 min

CH3 carbons

CH2 carbons

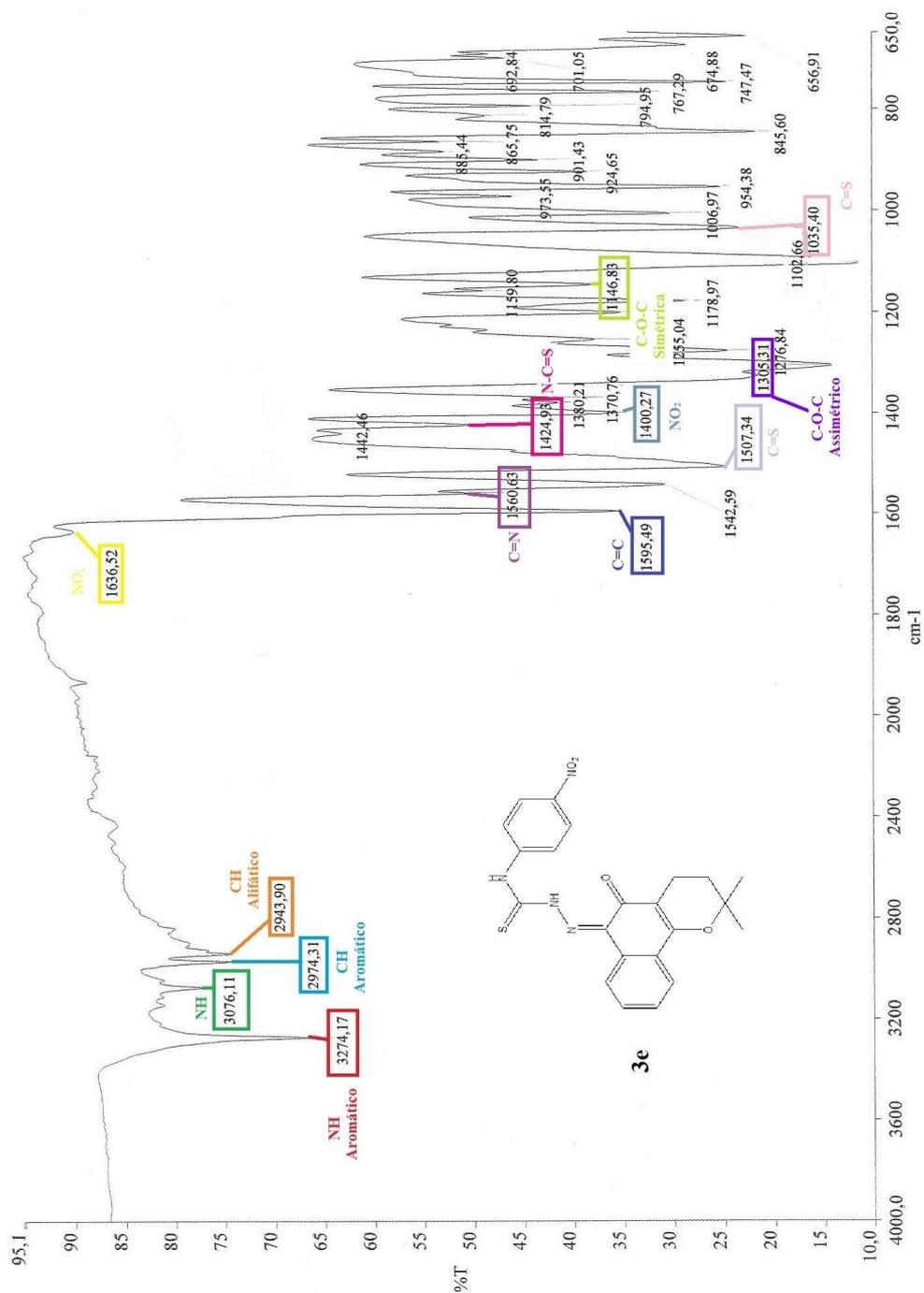
CH carbons

quaternary carbons

200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

**Anexo 6 – Espectros do derivado 3e: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(4-nitrofenil)hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

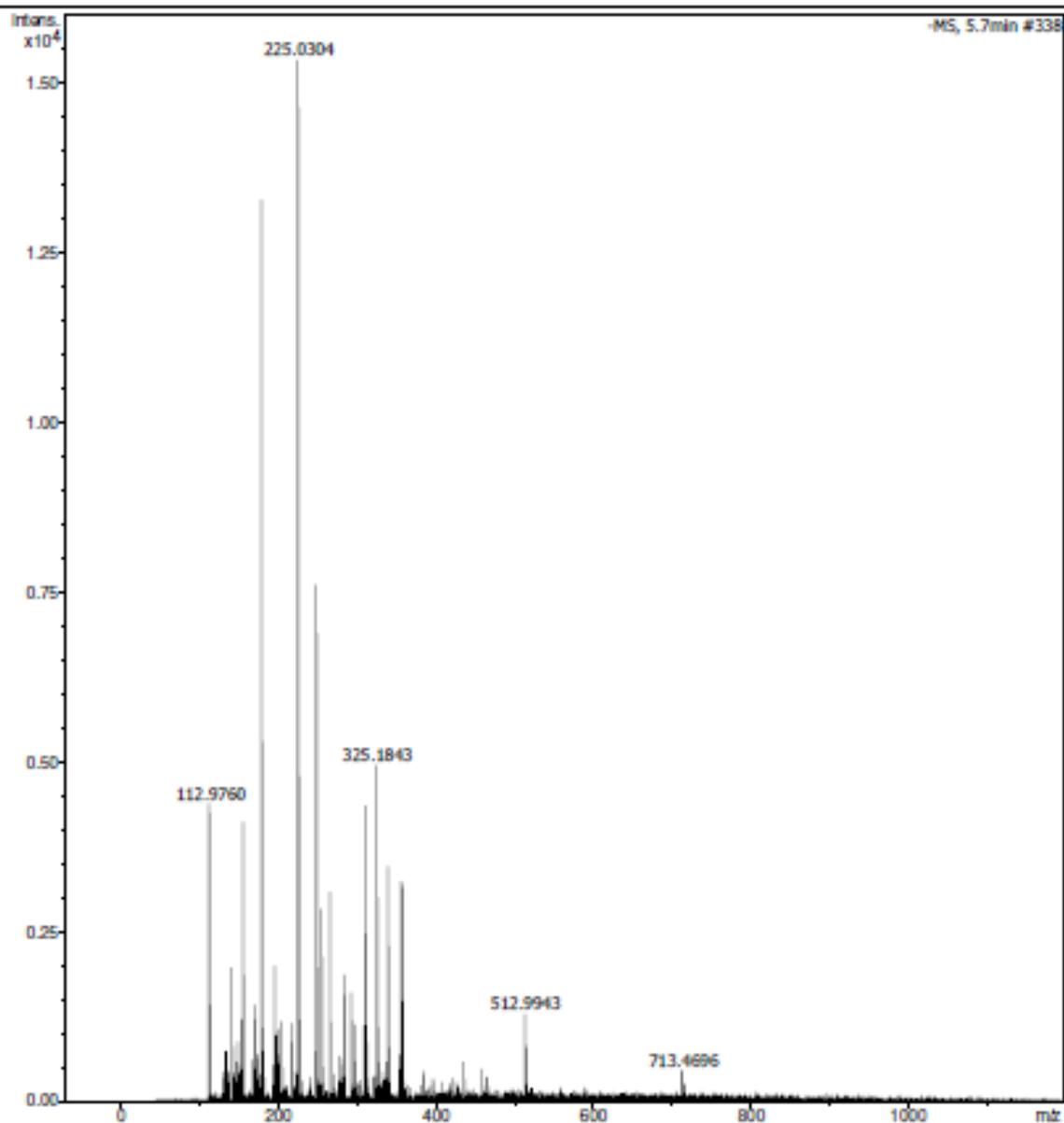
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-3\_NEG.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-3\_NEG  
Comment

Acquisition Date 2/12/2014 9:29:12 AM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

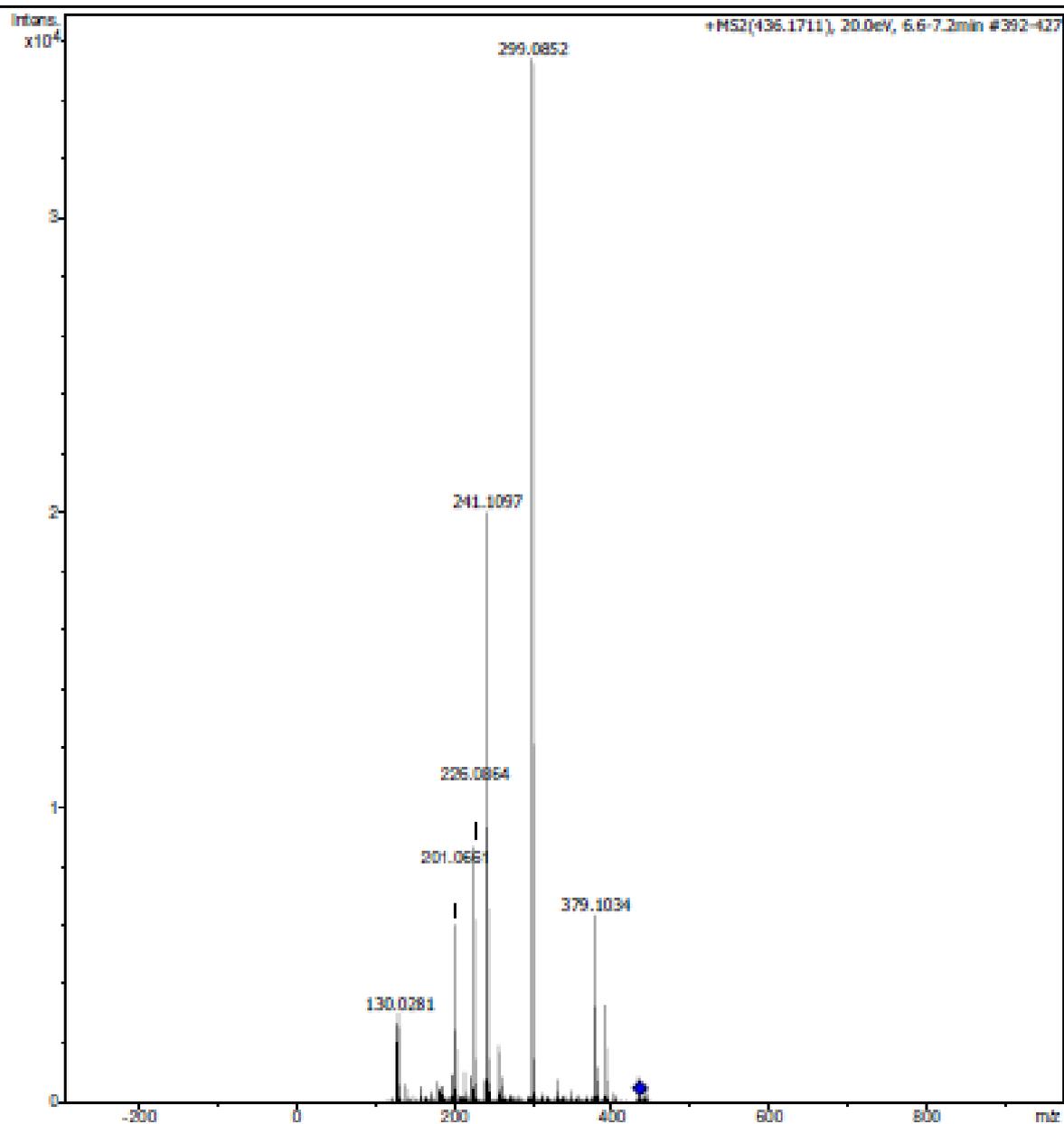
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-3\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-3\_POS  
Comment

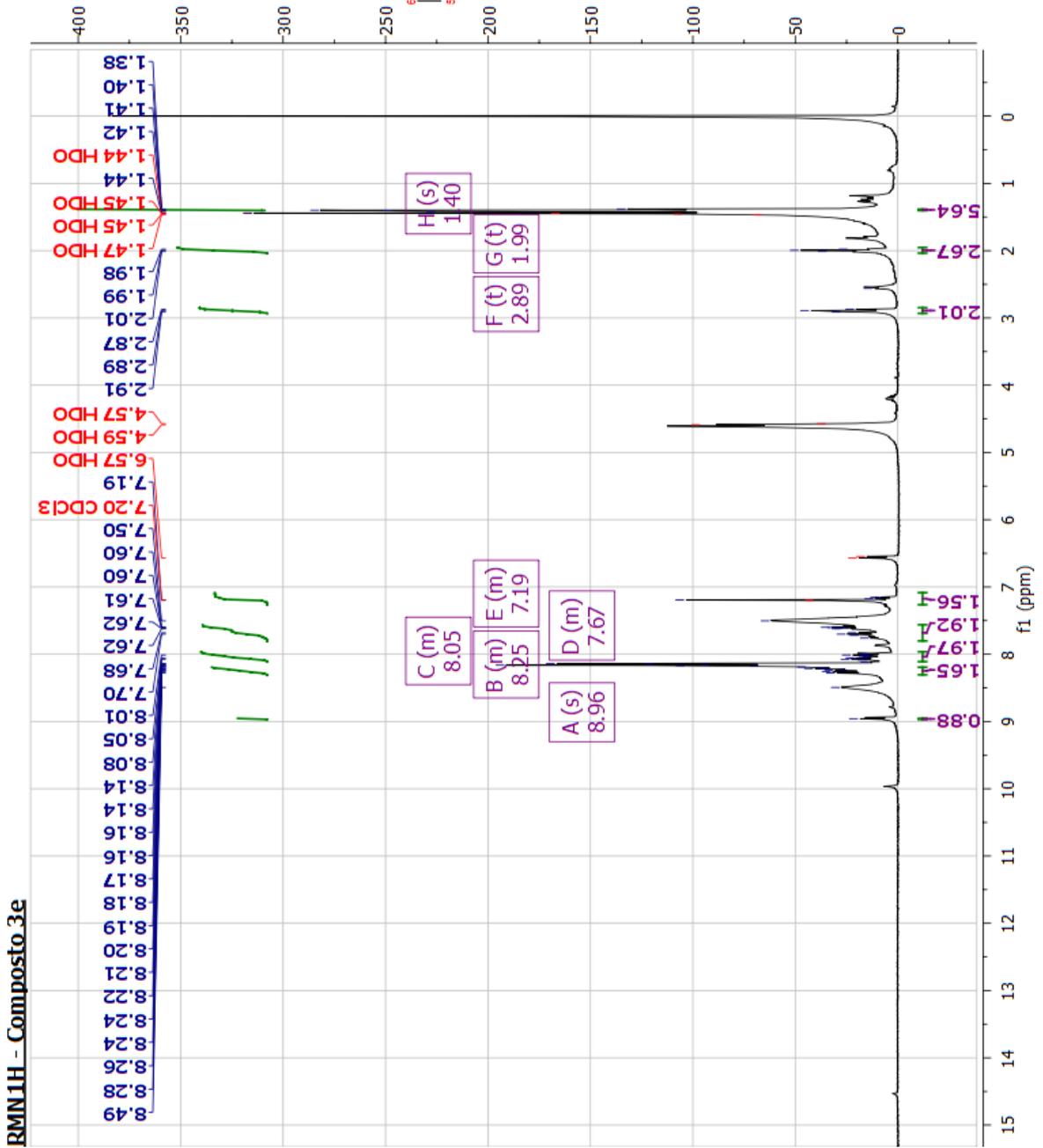
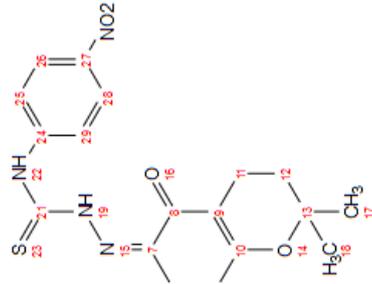
Acquisition Date 2/11/2014 4:57:10 PM

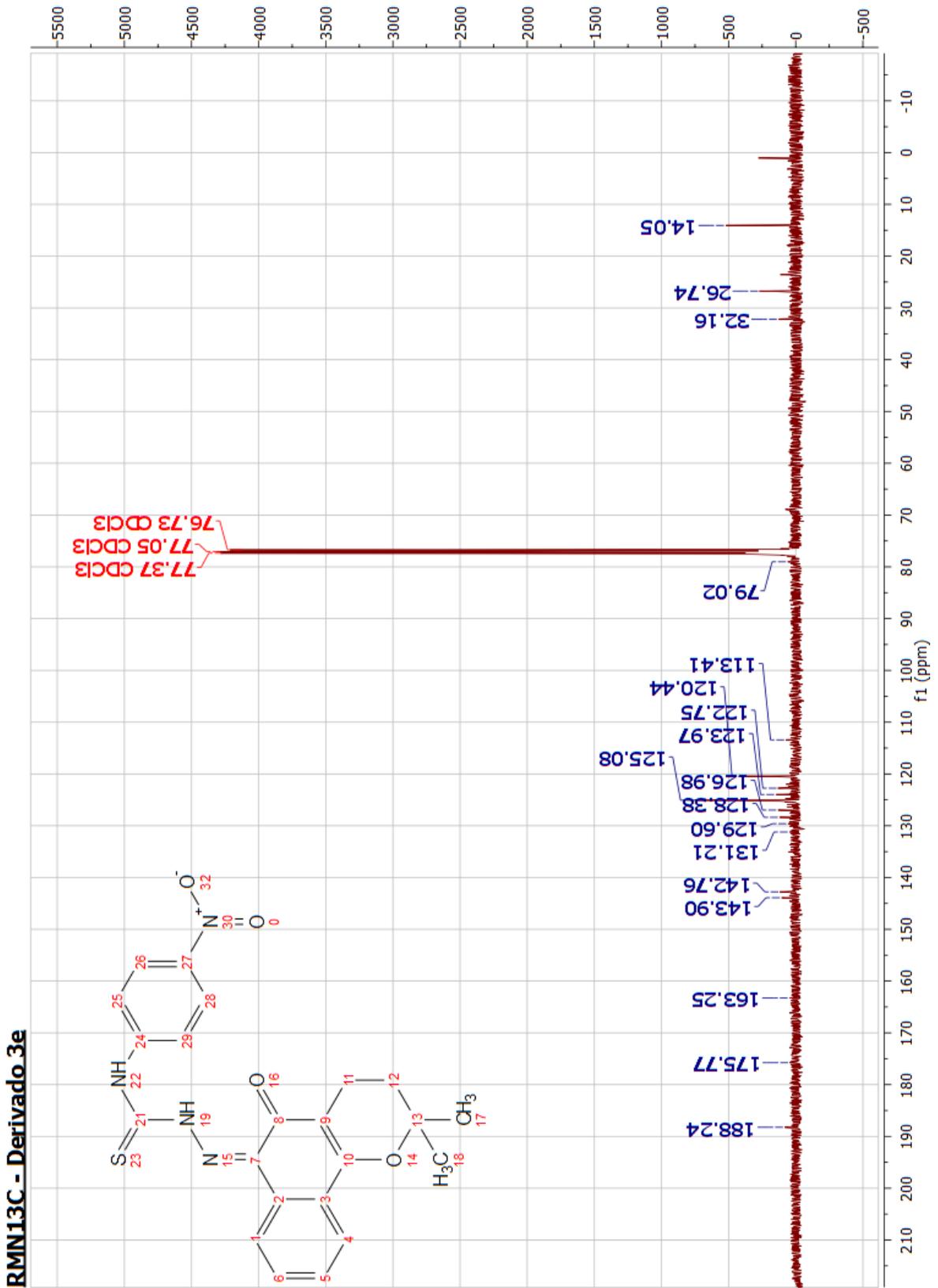
Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II

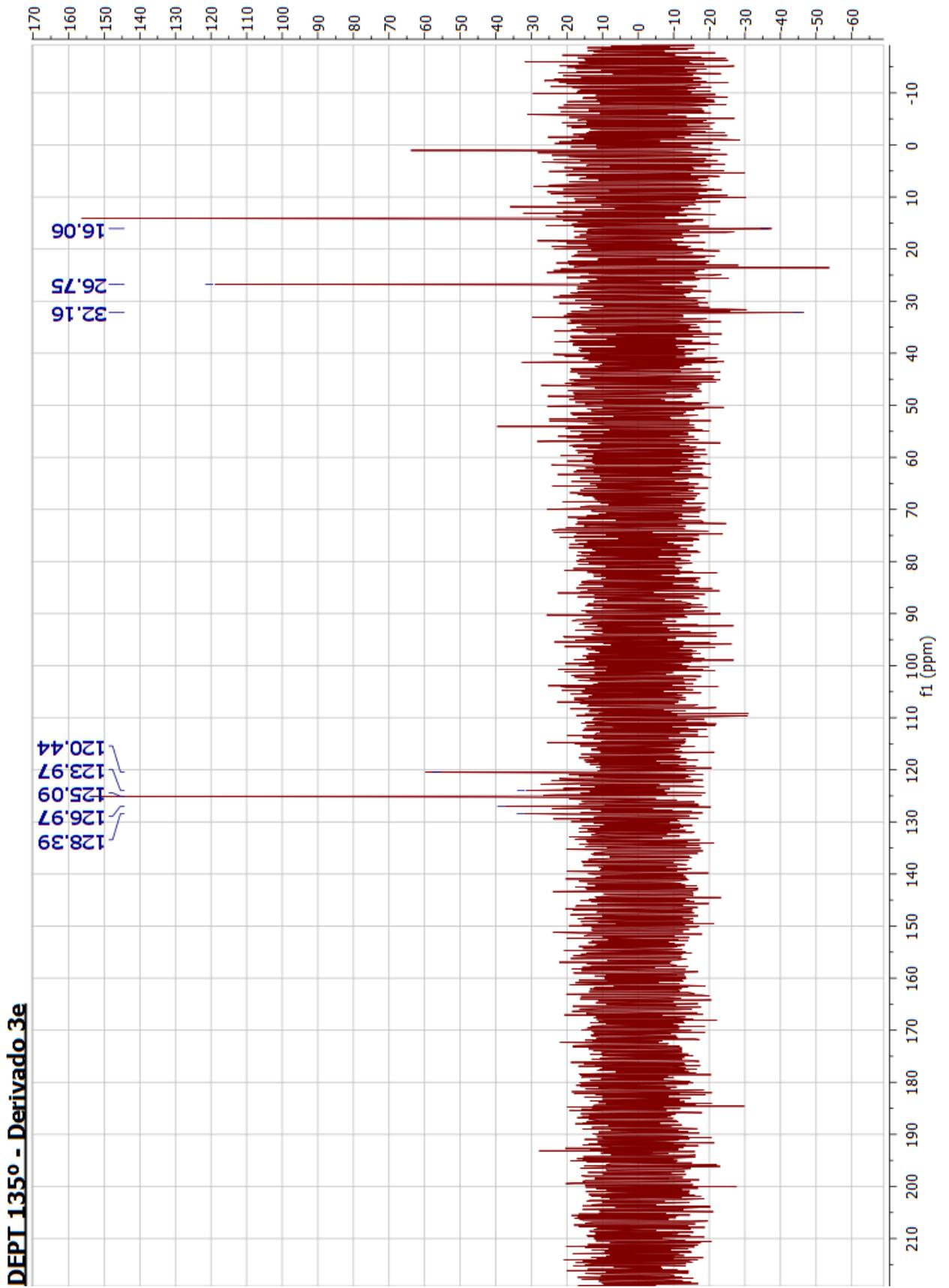


RMN<sup>1</sup>H

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.96 (s, 1H), 8.31 – 8.19 (m, 2H), 8.11 – 7.96 (m, 2H), 7.80 – 7.56 (m, 2H), 7.26 – 7.08 (m, 2H), 2.89 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.99 (t, J = 6.6 Hz,

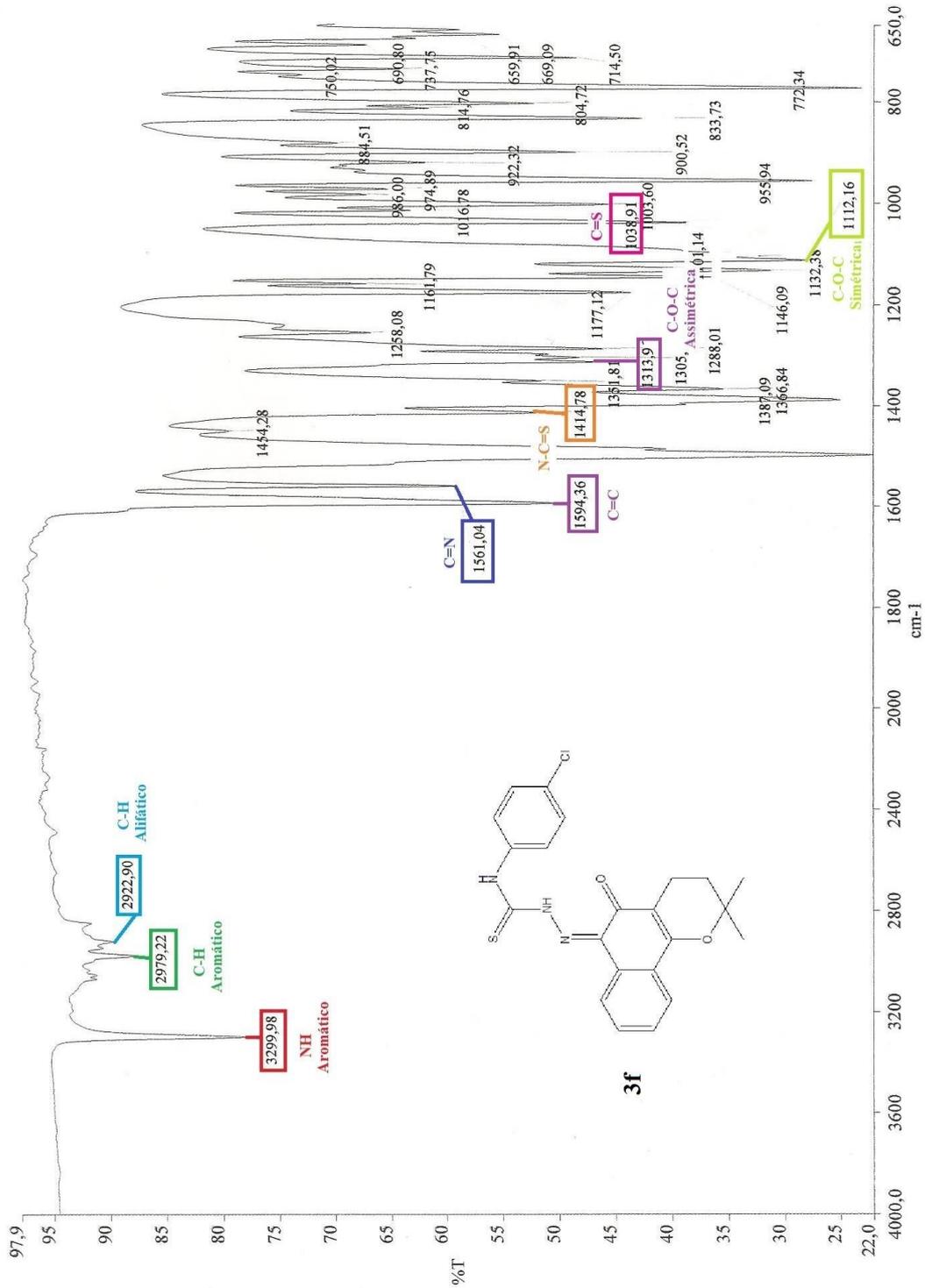


RMN<sup>13</sup>C



**Anexo 7 – Espectros do derivado 3f: (Z)-N-(4-clorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]chromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

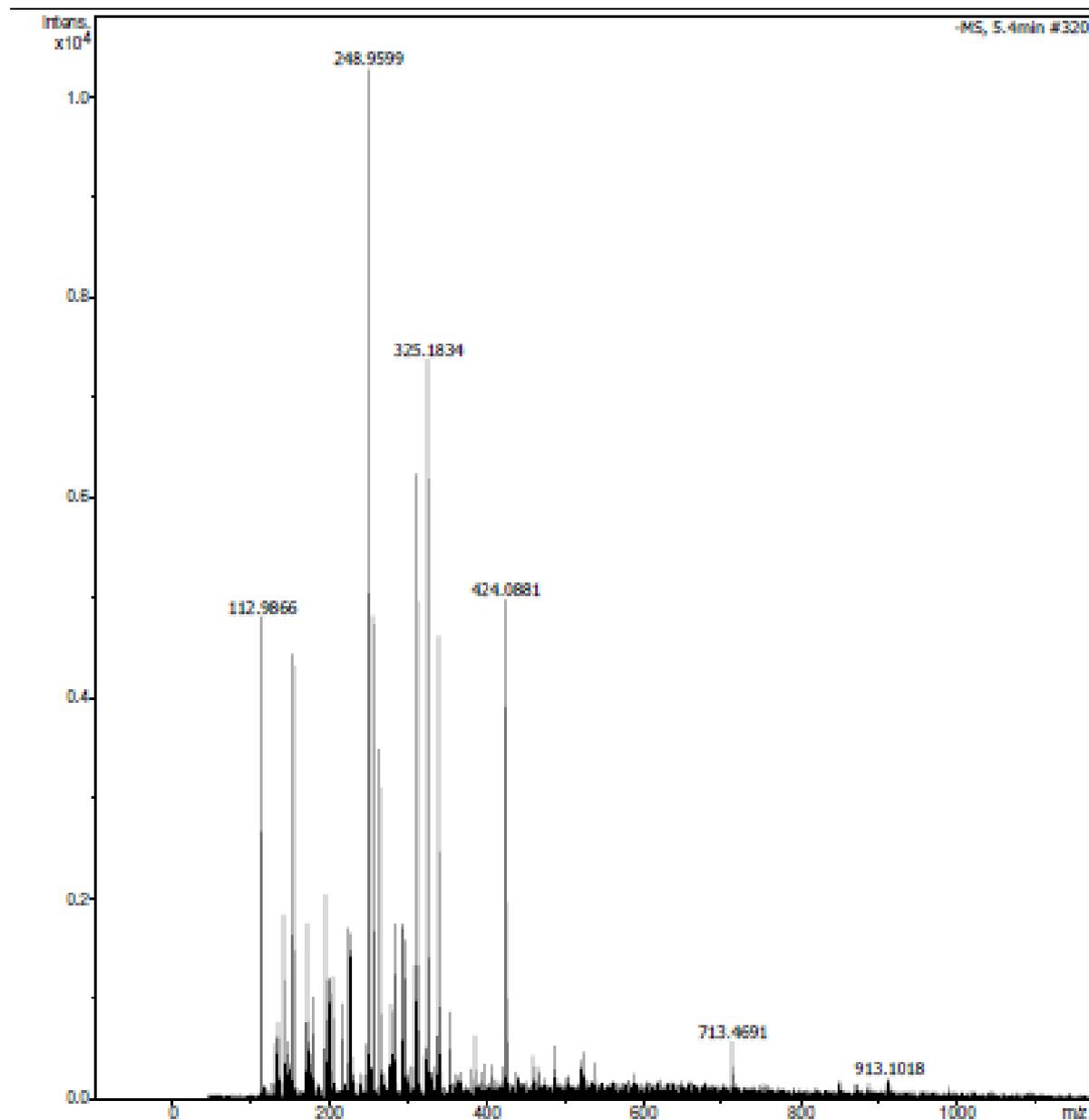
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-4\_NEG.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-4\_NEG  
Comment

Acquisition Date 2/12/2014 9:45:07 AM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

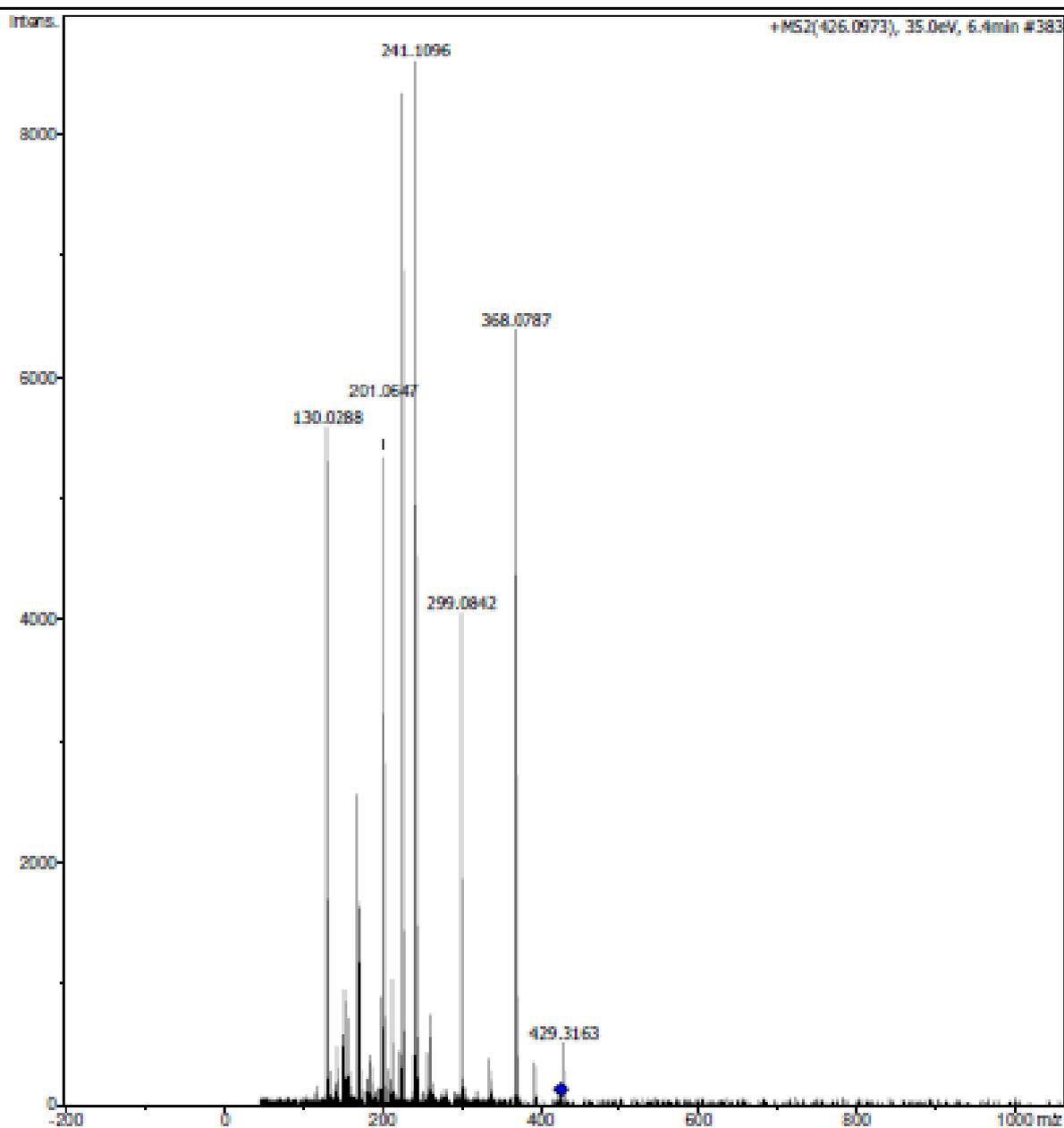
Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-4\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-4\_POS  
Comment

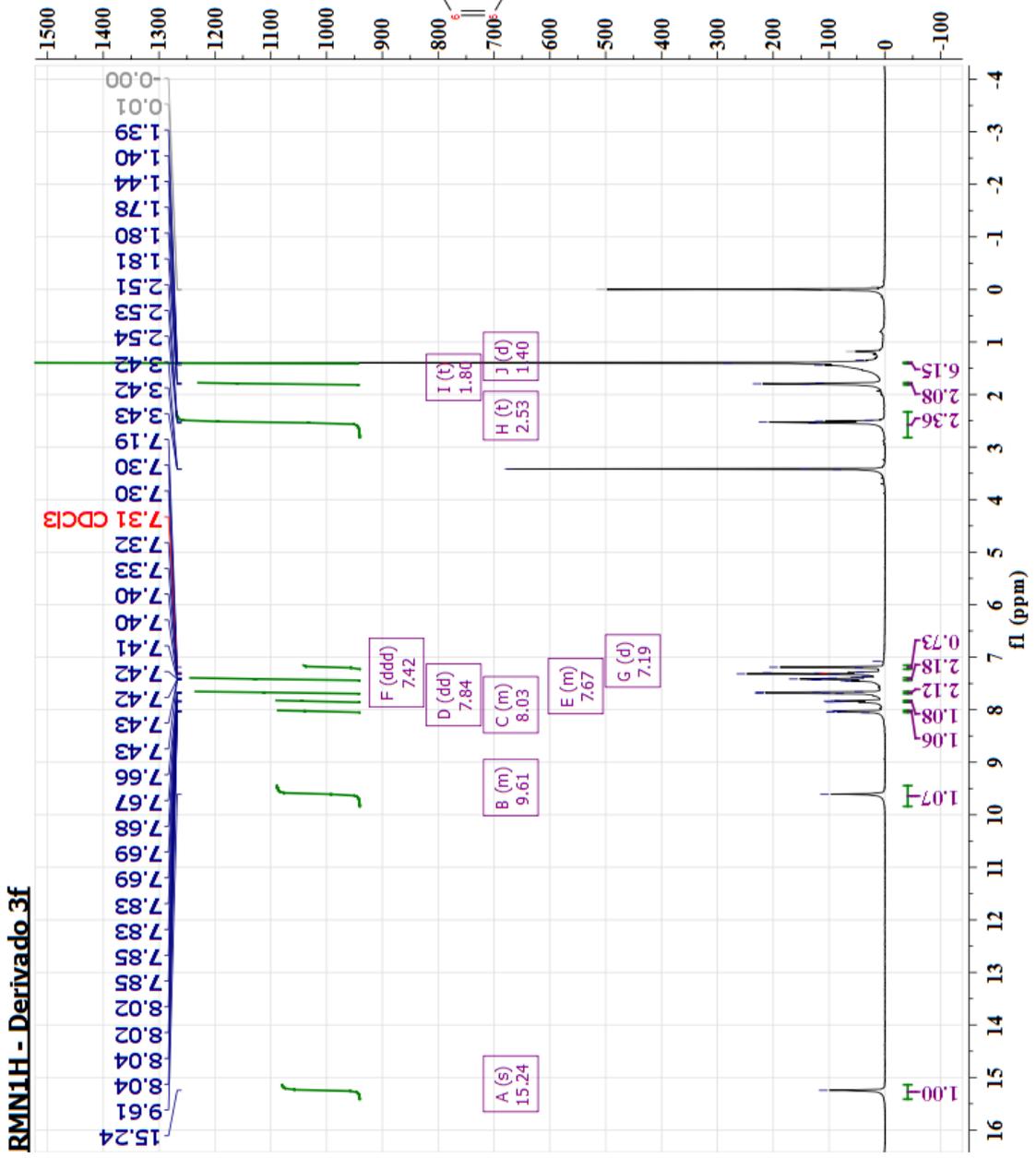
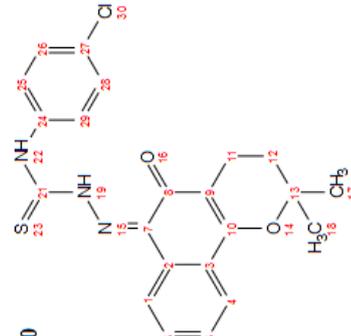
Acquisition Date 2/11/2014 4:35:02 PM

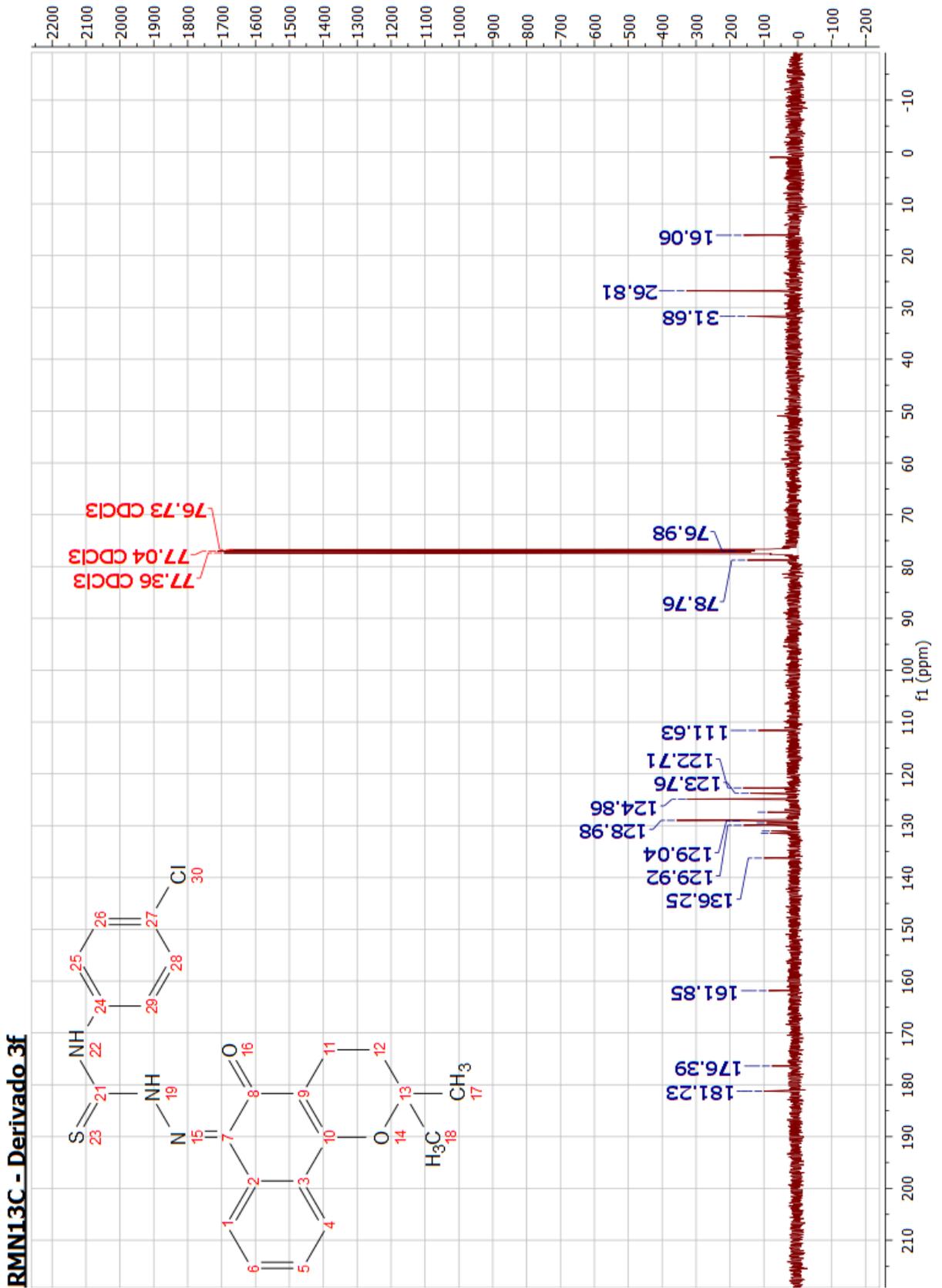
Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II

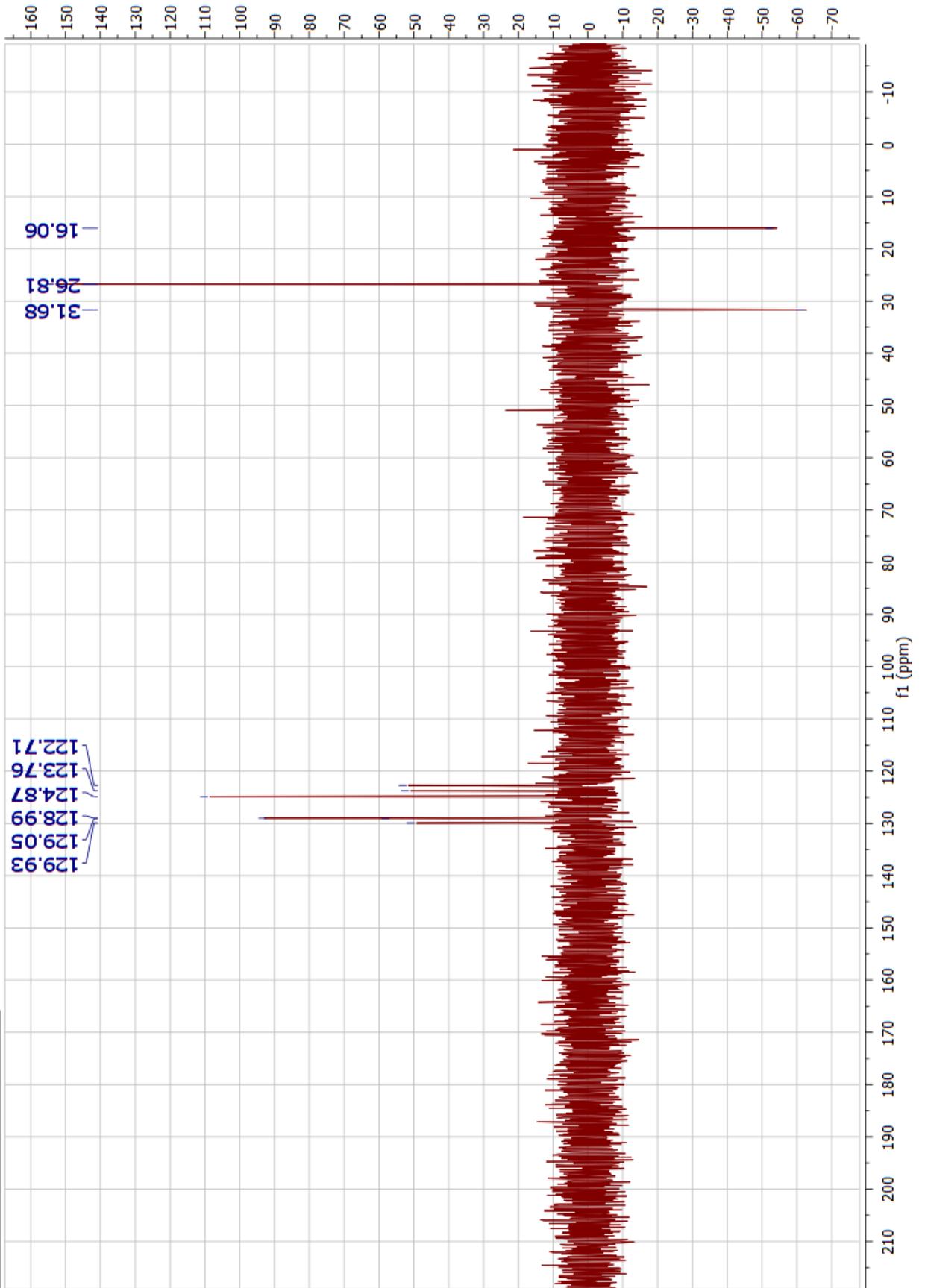


**RMN<sup>1</sup>H**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 15.24 (s, 1H), 9.84 – 9.45 (m, 1H), 8.05 – 8.01 (m, 1H), 7.84 (dd, J = 7.4, 1.9 Hz, 1H), 7.70 – 7.65 (m, 2H), 7.42 (ddd, J = 7.2, 5.0, 1.8 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 2.53 (t, J = 6.6

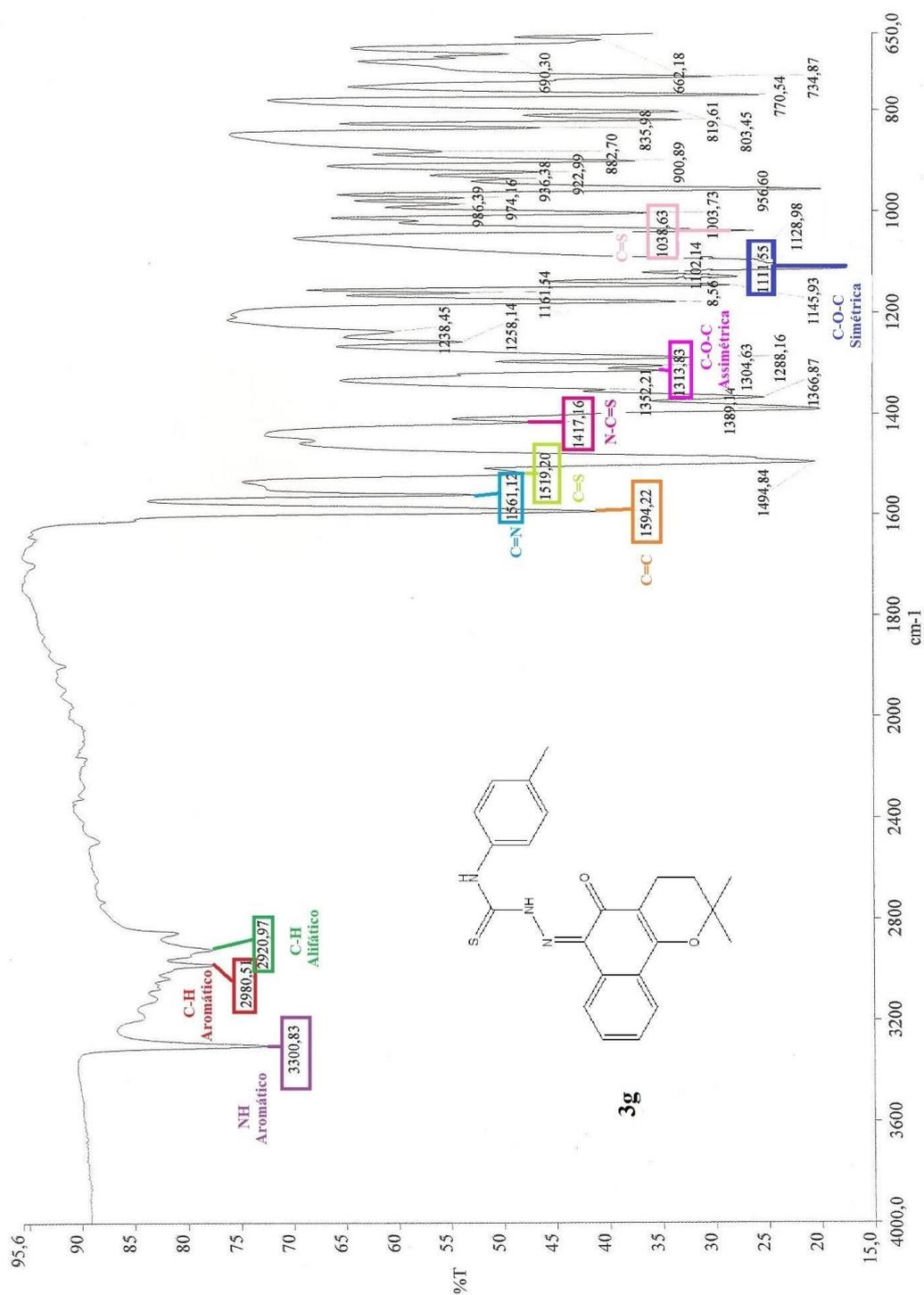


RMN<sup>13</sup>C

**DEPT 135° - Derivado 3f**

**Anexo 8 – Espectros do derivado 3g: (Z)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)-N-(p-toluil)hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

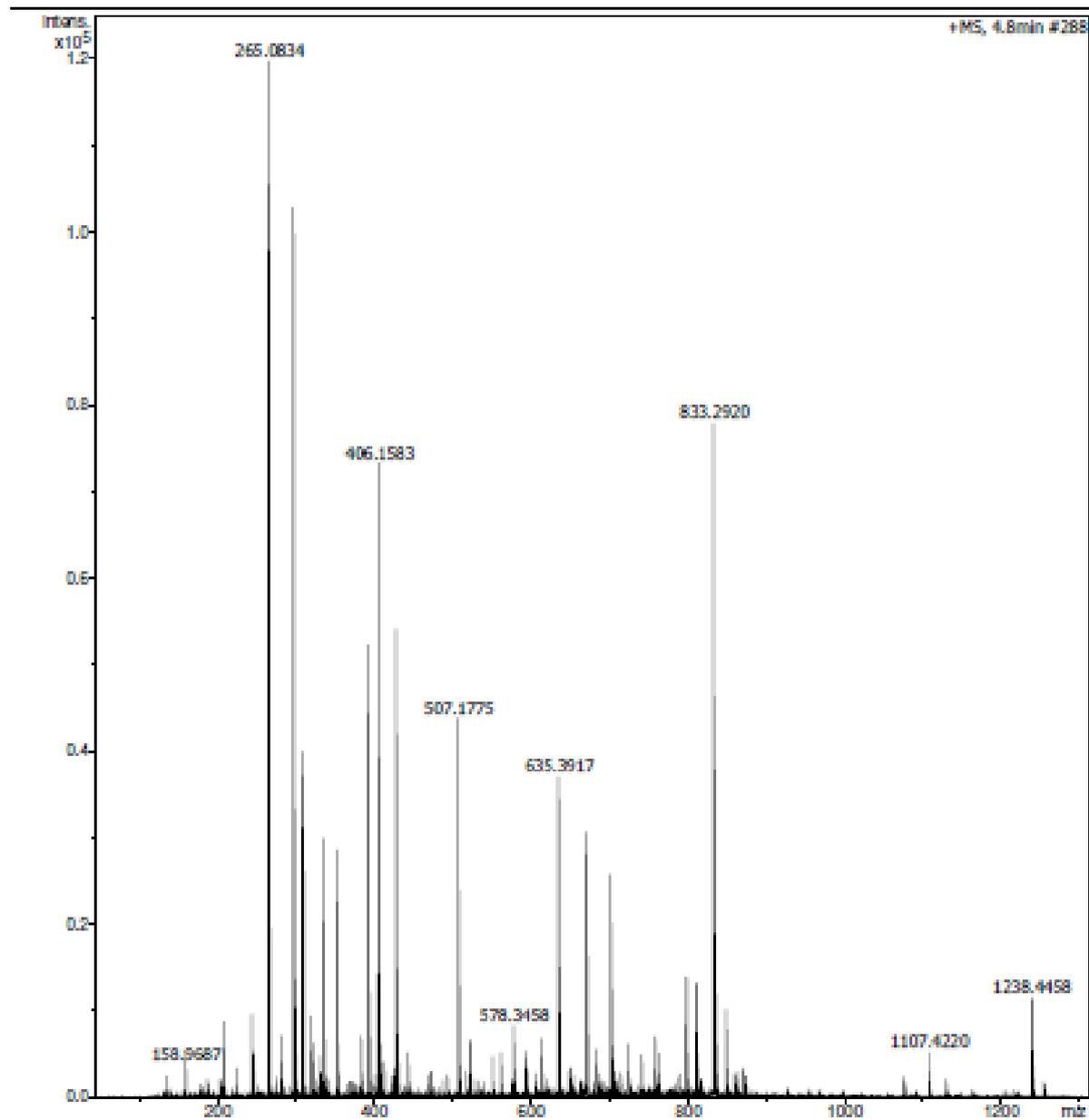
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-5\_POS.d  
Method Tuna\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-5\_POS  
Comment

Acquisition Date 2/11/2014 4:45:33 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

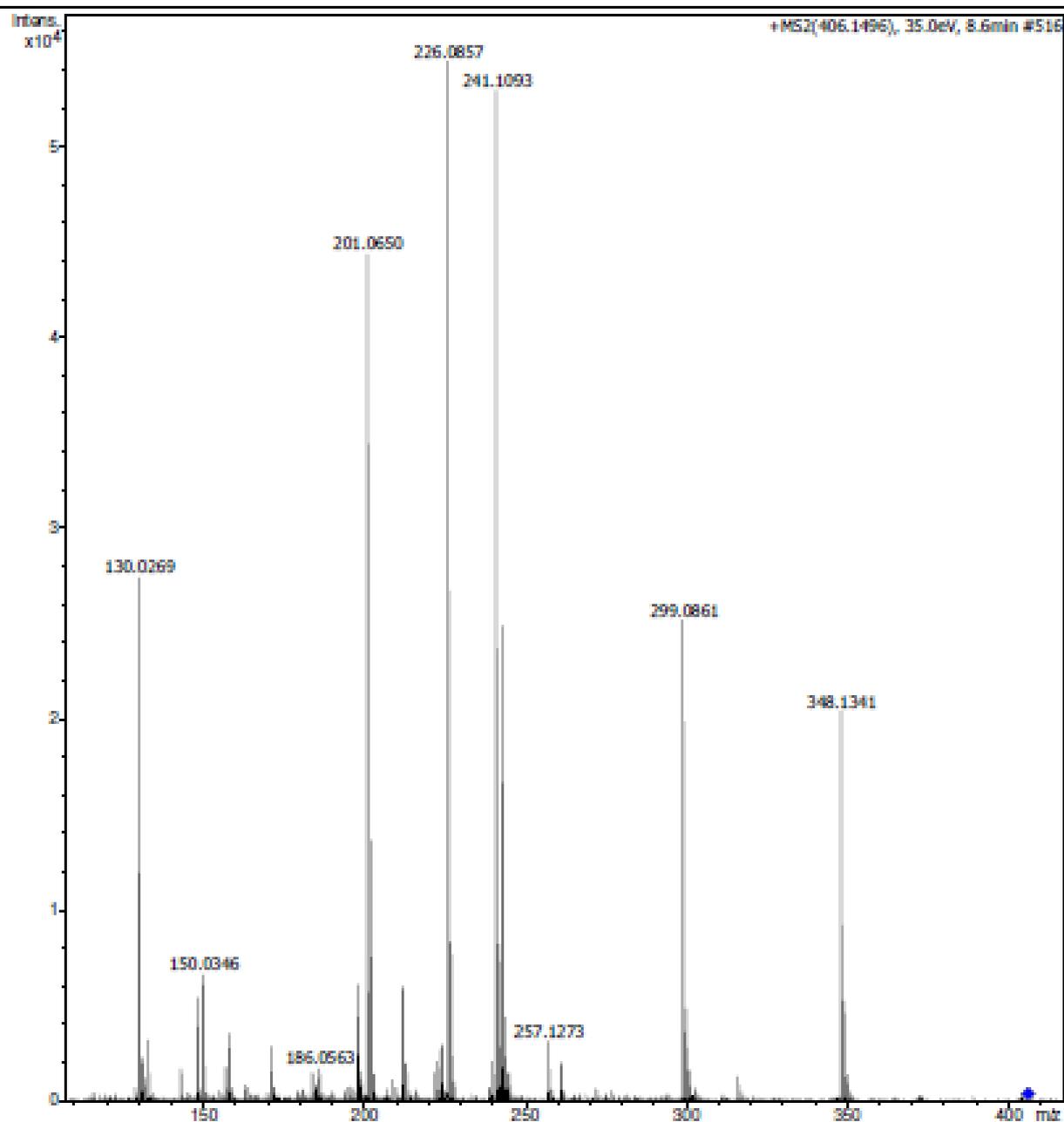
Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto-USP

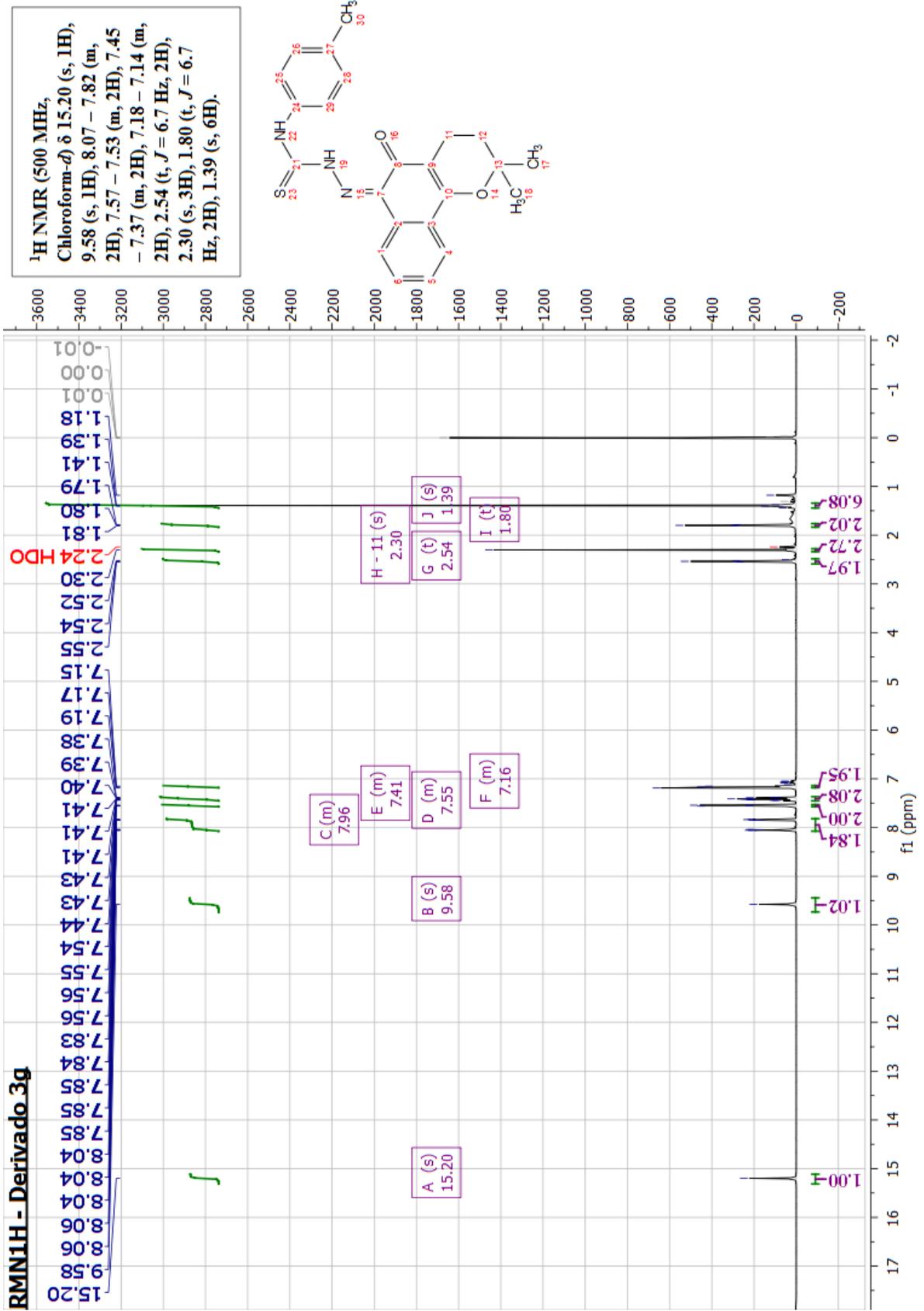
**Analysis Info**

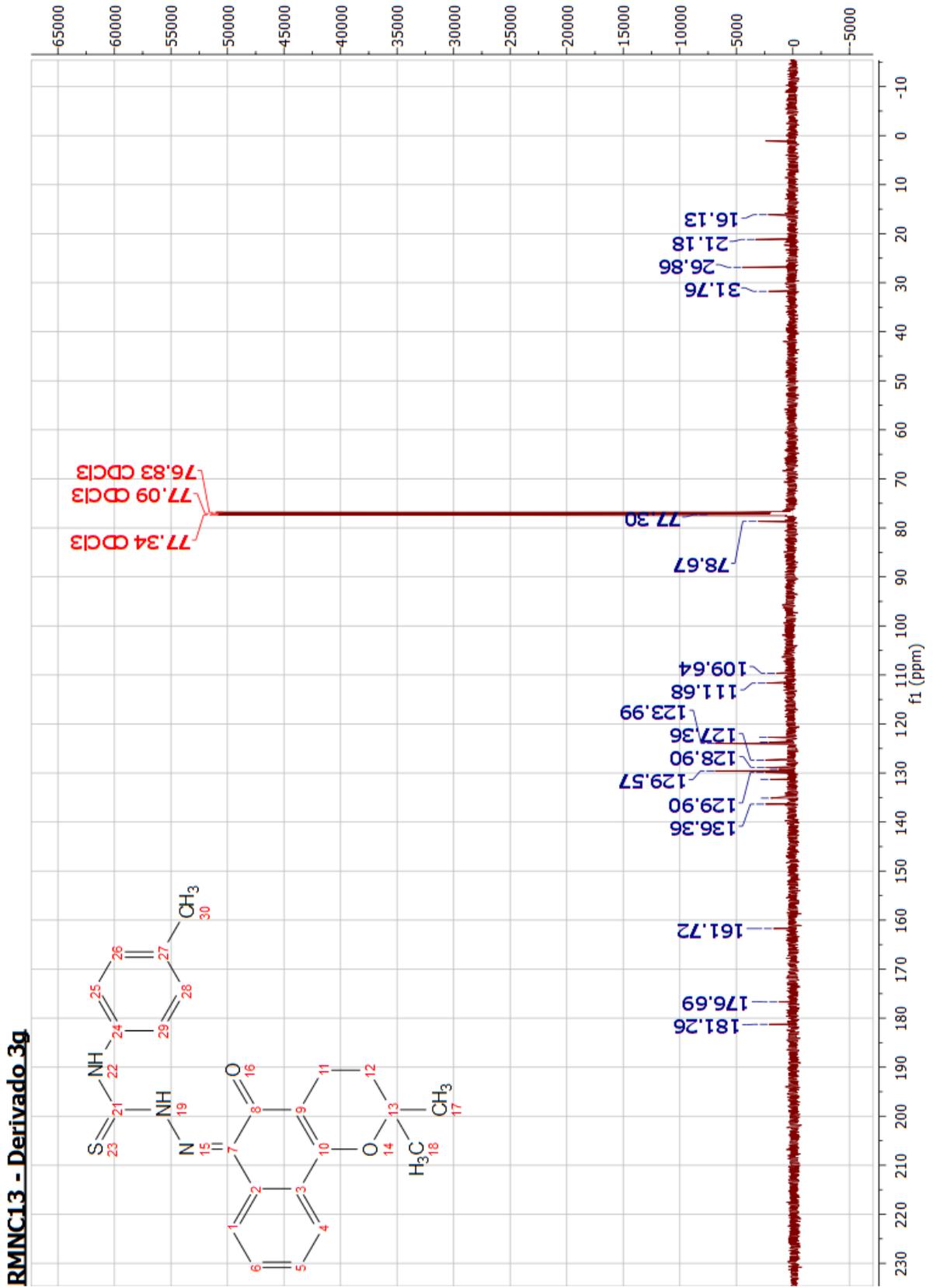
Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-5\_POS.d  
Method Tuna\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-5\_POS  
Comment

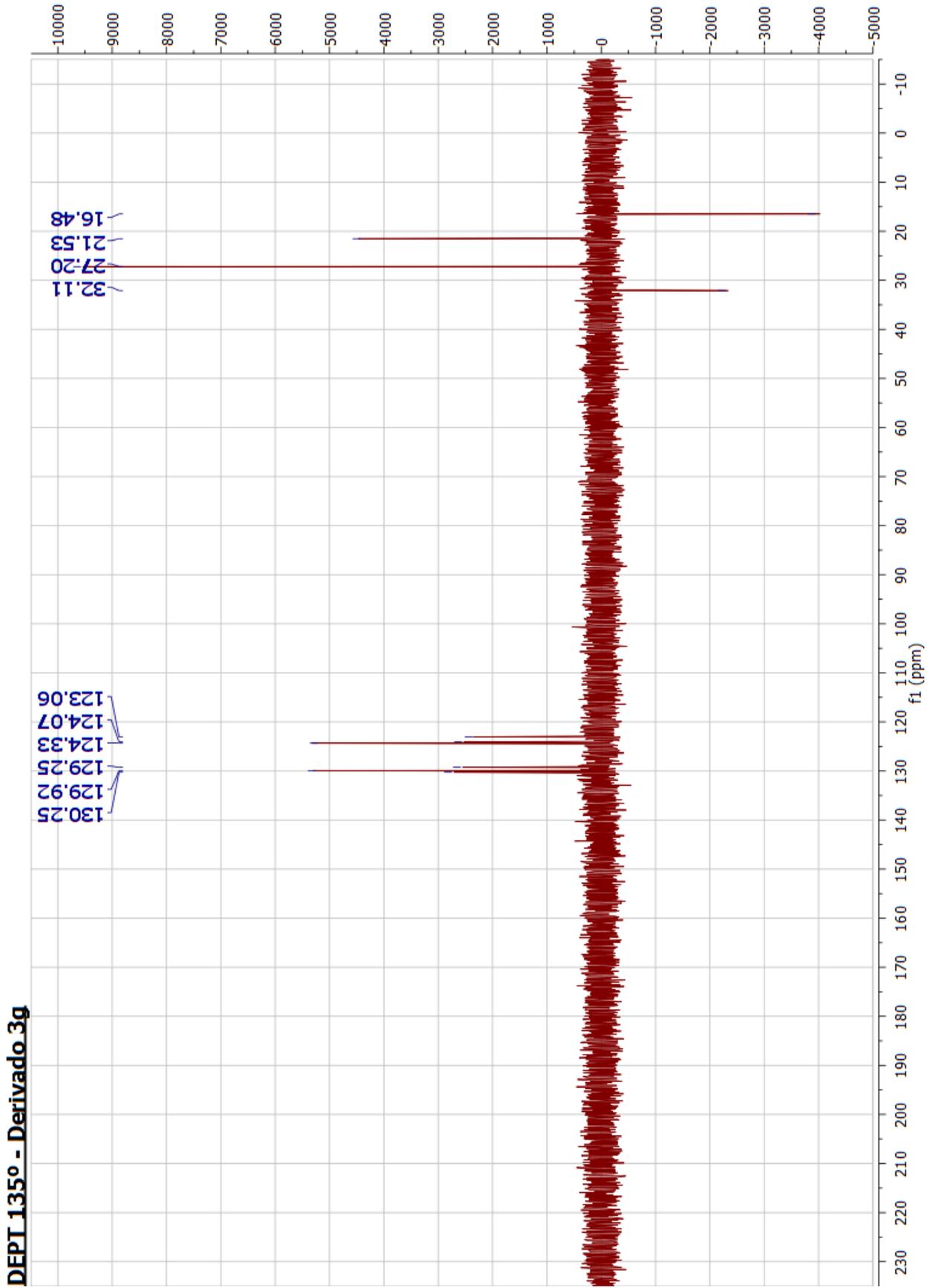
Acquisition Date 2/11/2014 4:45:33 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



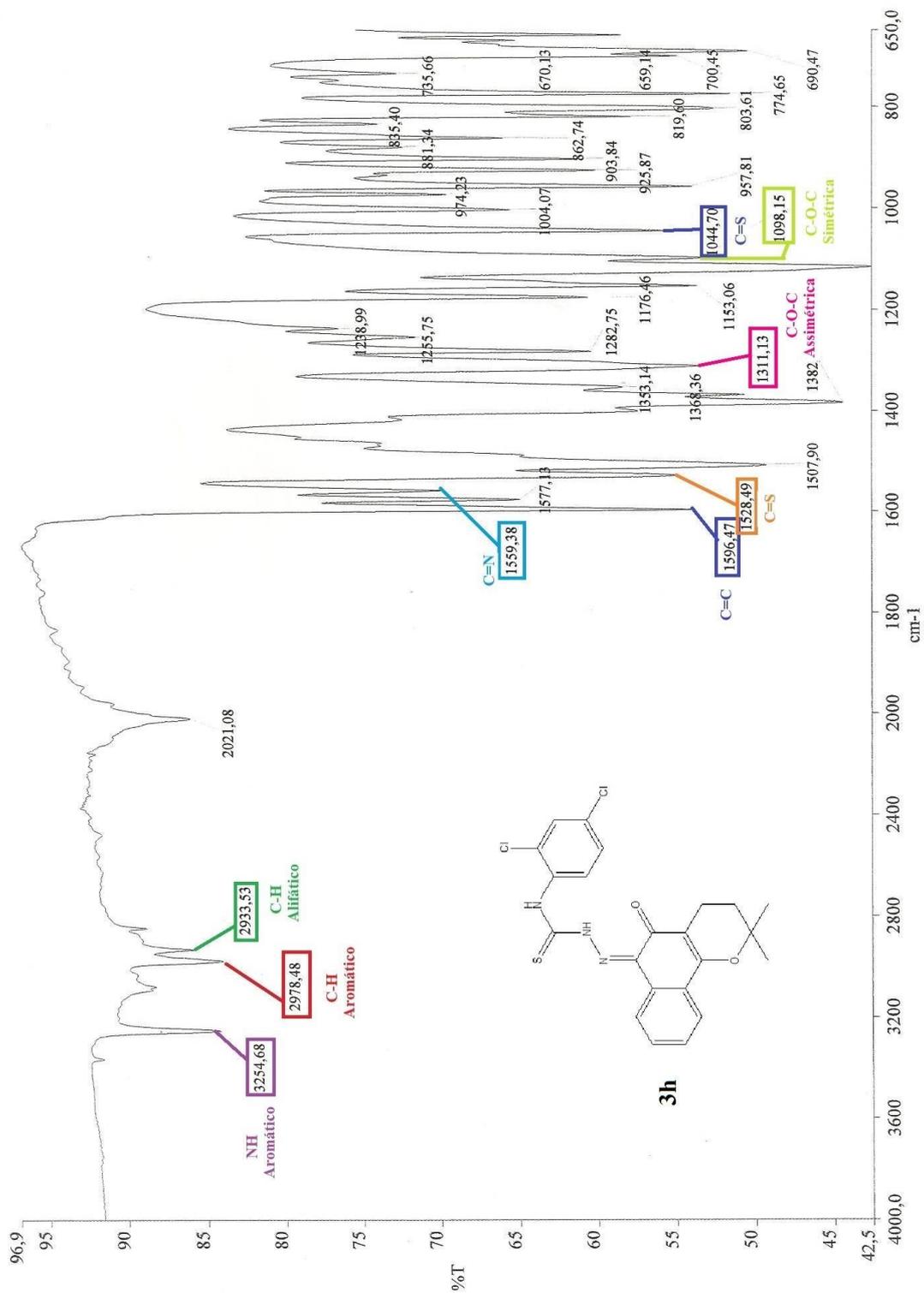
RMN<sup>1</sup>H

RMN<sup>13</sup>C



**Anexo 9 – Espectros do derivado 3h: (Z)-N-(2,4-diclorofenil)-2-(2,2-dimetil-5-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromen-6(5H)-ilideno)hidrazina-carbotioamida**

**Infravermelho**



## Massa de alta resolução

## Generic Display Report

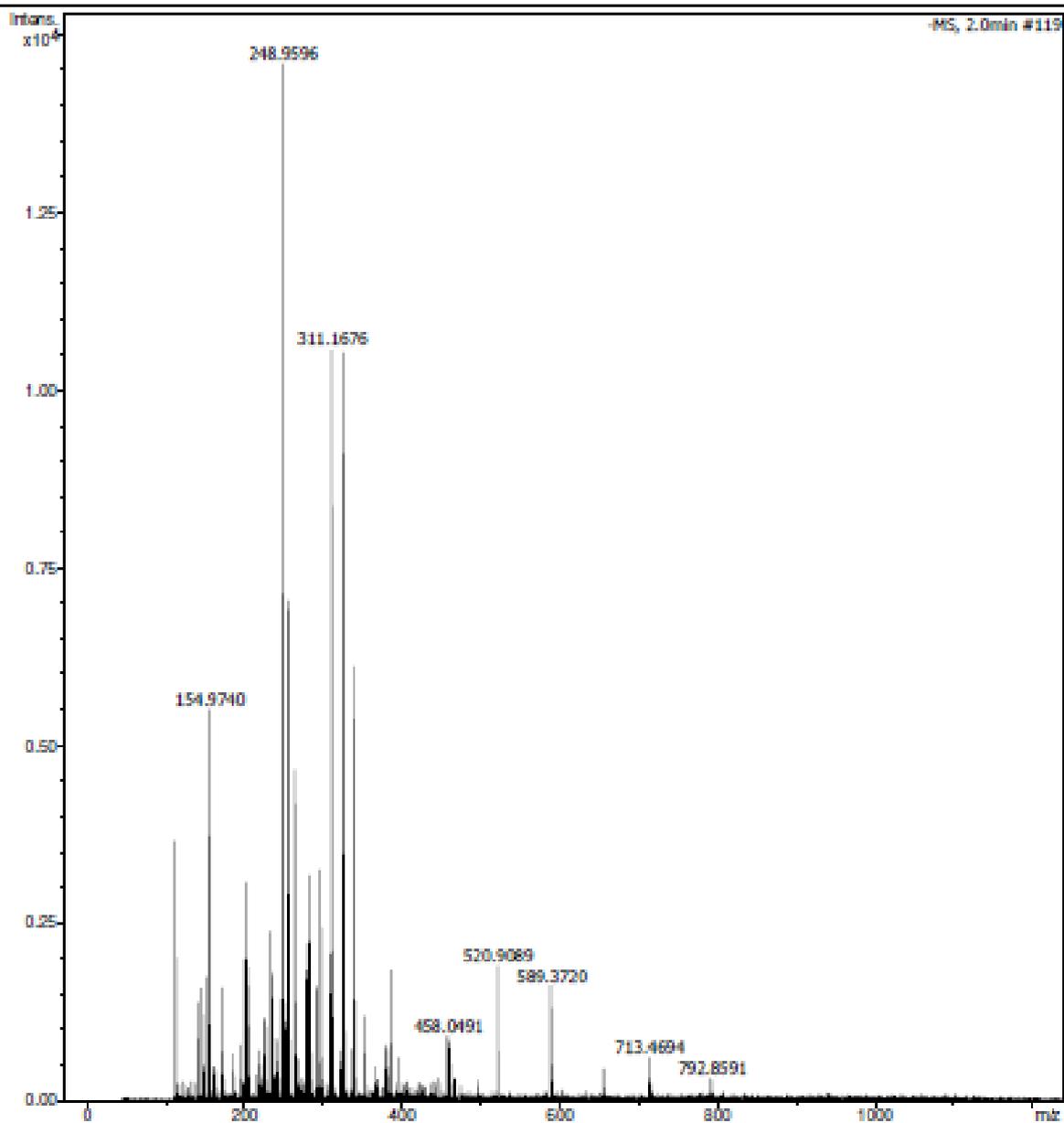
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

## Analysis Info

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-S\_NEG.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Neg\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-S\_NEG  
Comment

Acquisition Date 2/12/2014 9:07:39 AM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II



---

## Generic Display Report

---

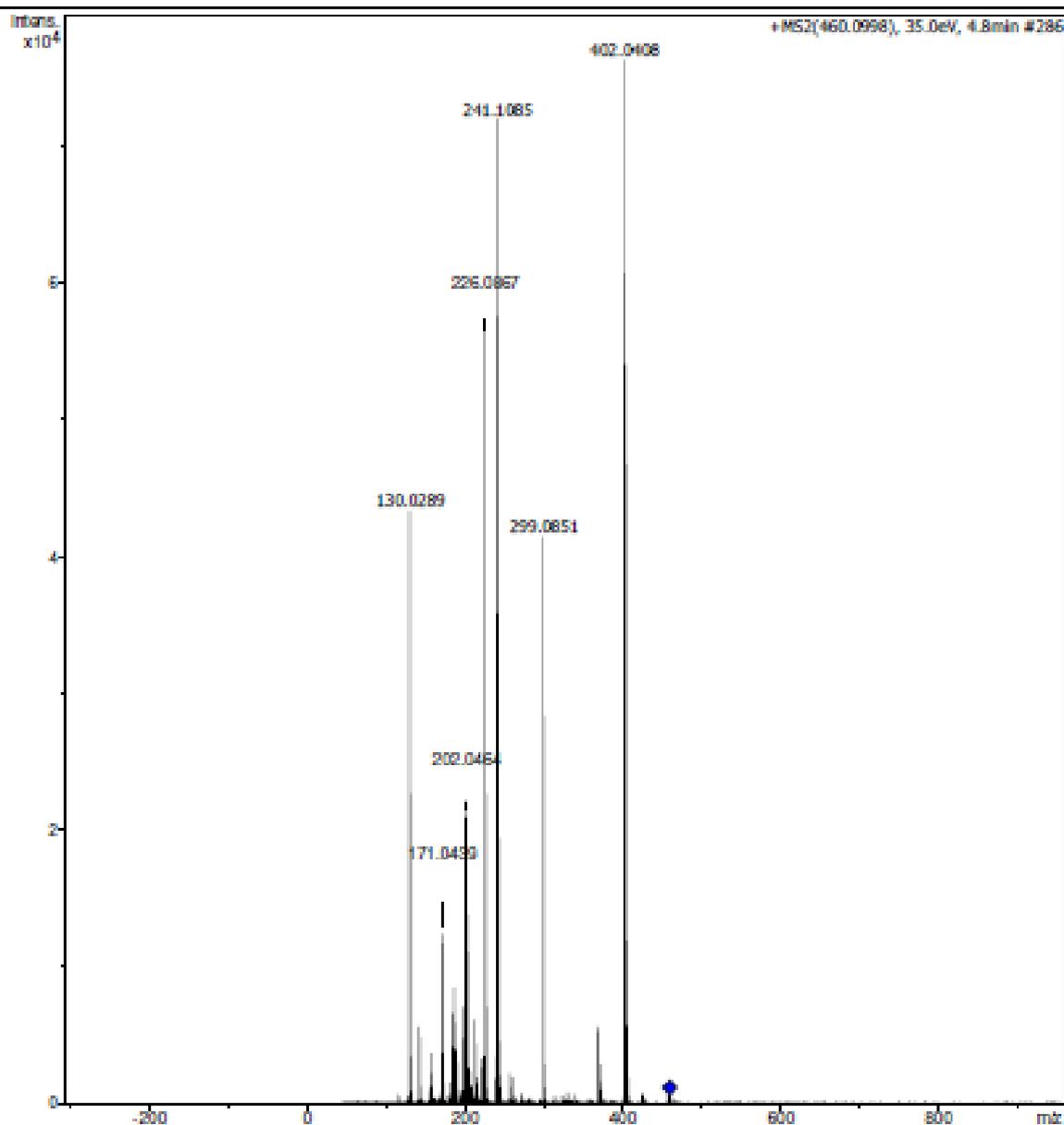
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

**Analysis Info**

Analysis Name D:\Data\GIBSON\_ISLA\BV-6\_POS.d  
Method Tune\_Low\_Tomaz\_Pos\_1300u\_NOVO.m  
Sample Name BV-6\_POS  
Comment

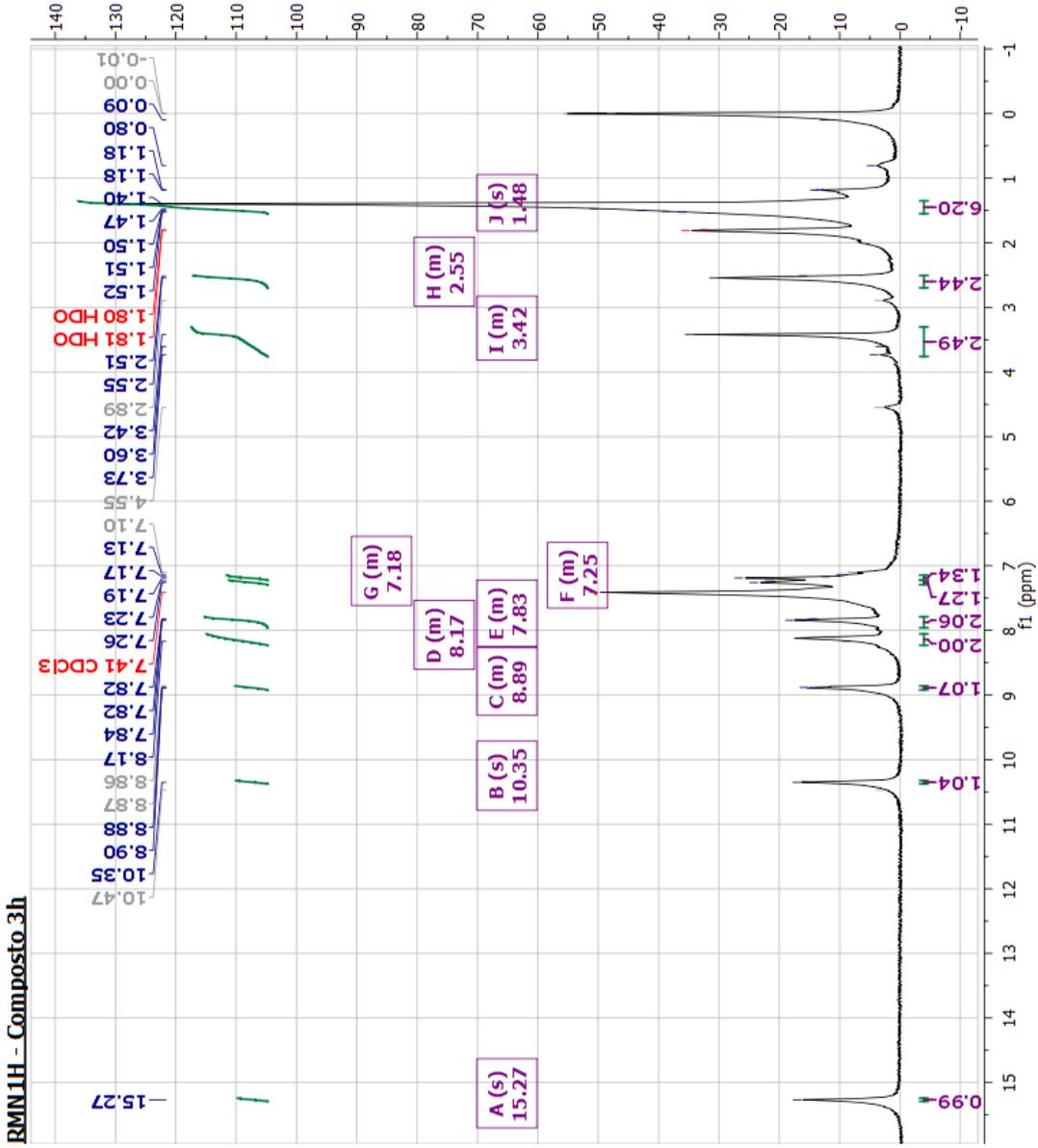
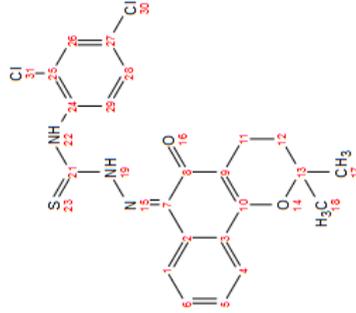
Acquisition Date 2/11/2014 5:23:13 PM

Operator BDAL@DE  
Instrument micrOTOF-Q II

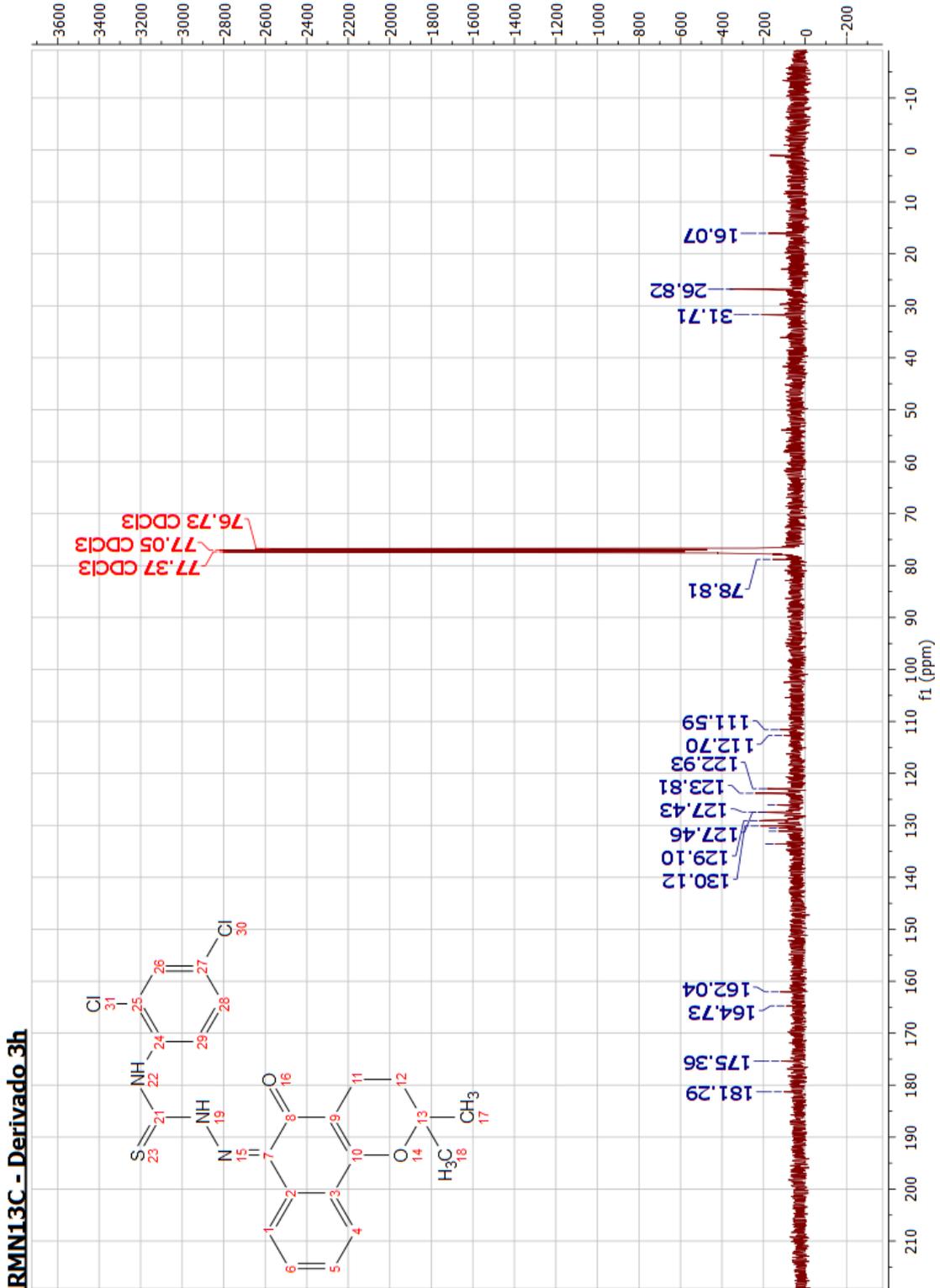


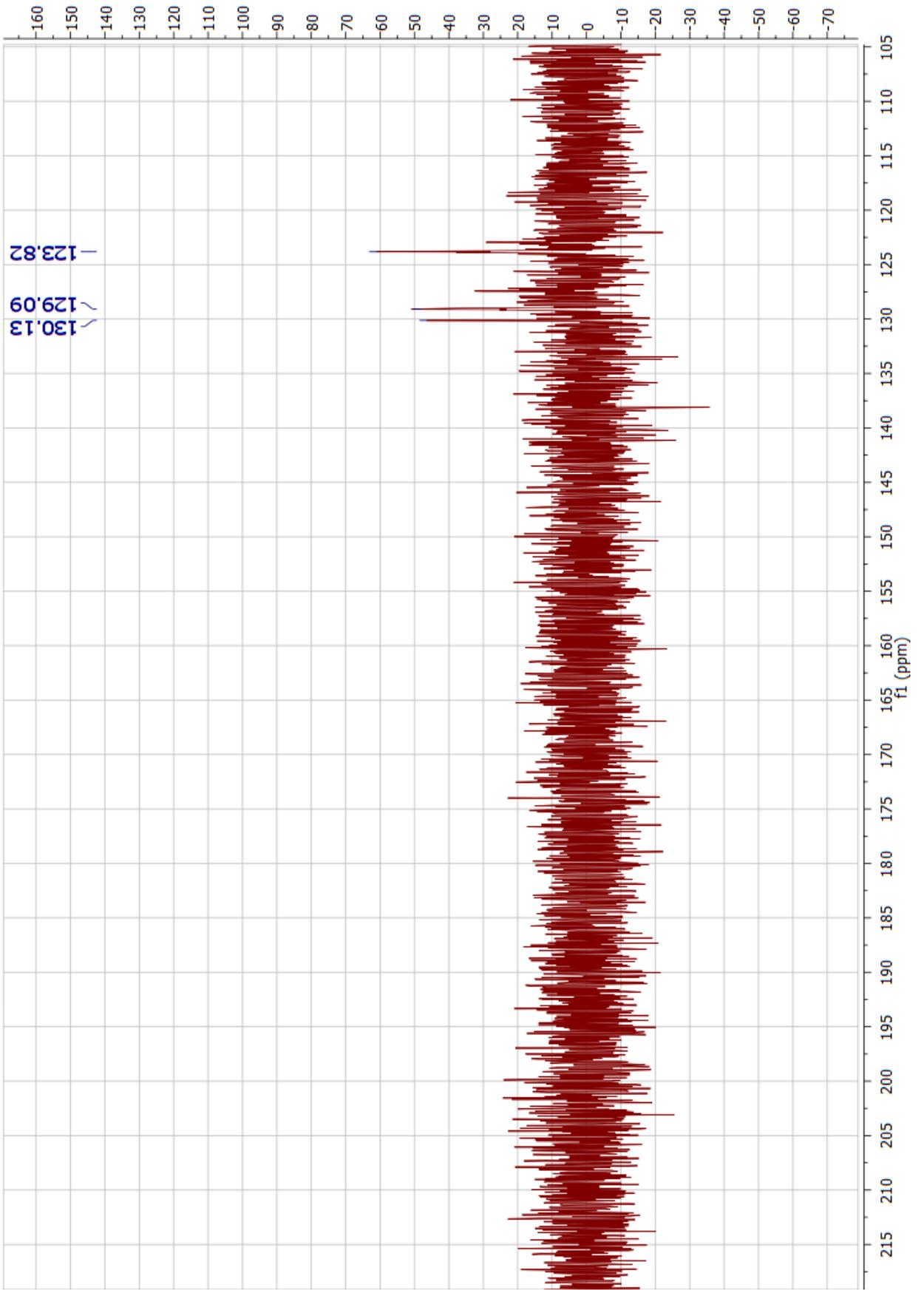
RMN<sup>1</sup>H

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 15.27 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.92 – 8.86 (m, 1H), 8.23 – 8.06 (m, 2H), 7.96 – 7.79 (m, 2H), 7.29 – 7.22 (m, 1H), 7.22 – 7.14 (m, 1H), 3.76 – 3.30 (m, 2H), 2.70 – 2.51 (m, 2H), 1.48 (s, 6H).



RMN1H - Composto 3h

RMN<sup>13</sup>C

**DEPT\_135° - Derivado\_3h**

## Anexo 10 - Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 31 de outubro de 2012.

Ofício nº 503/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof. Alexandre José da Silva**  
Departamento de Antibióticos  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.038385/2012-41

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Obtenção por irradiação por micro-ondas, caracterização da atividade esquistossomocida de derivados 4-tiazolidinônicos de naftoquinonas**".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do LIKA - UFPE; Animais: Camundongos; Linhagem: *Swiss Webster*, Sexo: fêmeas; Idade: 28 dias; Peso: 25±2g; Número de animais previsto no protocolo: 75

  
Prof. Maria Teresa Jansem  
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

## **APÊNDICES**

## Apêndice 1 - Artigo Publicado na Revista *Experimental Parasitology*

Experimental Parasitology 142 (2014) 83–90



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



### Ultrastructural analysis of $\beta$ -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms



André de Lima Aires<sup>a,b</sup>, Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes<sup>c</sup>, Renata Alexandre Ramos Silva<sup>c</sup>, Vanessa Xavier Barbosa<sup>c</sup>, Alexandre José da Silva Góes<sup>c</sup>, Christina Alves Peixoto<sup>d</sup>, Valdênia Maria Oliveira Souza<sup>a</sup>, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

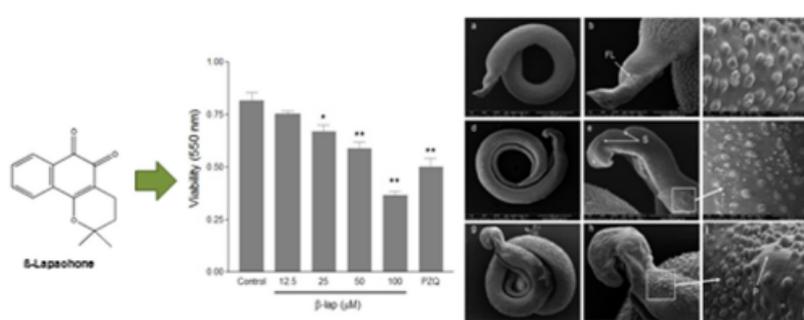
<sup>c</sup>Centro de Ciências Biológicas – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>d</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Biologia Celular Ultraestrutura, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil

#### HIGHLIGHTS

- $\beta$ -lap exhibited effect against adult *Schistosoma mansoni* with  $IC_{50}$  61.33  $\mu$ M.
- $\beta$ -lap alters the motility, causing death and make unfeasible cells.
- $\beta$ -lap caused progressive surface membrane damage.

#### GRAPHICAL ABSTRACT



#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 9 August 2013

Received in revised form 8 April 2014

Accepted 17 April 2014

Available online 24 April 2014

##### Keywords:

$\beta$ -Lapachone

*Schistosoma mansoni*

Ultrastructural analysis

Tegument

#### ABSTRACT

The present study provides, for the first time, conclusions on the *in vitro* schistosomicidal properties of  $\beta$ -lap. Adult male *Schistosoma mansoni* worms of the BH strain were used for the study. Motility, mortality, cell viability and alterations in the tegument were employed as schistosomicidal parameters. Alterations in motility were observed 6 h after incubation in concentrations of 50 and 100  $\mu$ M.  $\beta$ -lap decreased significantly the worm viability, reducing the formation of formazan in 17.7%, 27.4% and 54.8% at concentrations of 25, 50 and 100  $\mu$ M, respectively. Mortality in concentrations of 50 and 100  $\mu$ M was of 67% and 100%, respectively, after 24 h. The death of the parasite was preceded by progressive surface membrane damage, characterized by tegument peeling, spine reduction and erosion, blister formation and rupture, and the emergence of holes. In addition to this, in the anterior portion, intense general edema, areas of cracking with a wrinkled surface, furrows and a fibrous appearance were also observed. The results of the present study thus provide a sound basis for further in-depth studies of the schistosomicidal properties of  $\beta$ -lap, both in the laboratory and in the field.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Departamento de Medicina Tropical e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brazil

E-mail address: [jcmonica@globo.com](mailto:jcmonica@globo.com) (M.C.P. de Azevedo Albuquerque).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.010>  
0014-4894/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Human schistosomiasis, a chronic disease caused by trematode blood-dwelling worms of the genus *Schistosoma*, is considered one of the most prevalent and debilitating neglected diseases in tropical and subtropical areas. It is estimated to be endemic in 78 countries and territories, where 779 million people are at constant risk of contracting the disease, and approximately 239 million are actually infected. From these numbers, 120 million are symptomatic and 20 million have serious consequences; 280,000 people die every year due to this disease (Utzinger et al., 2009; WHO, 2012). Typically, disease pathology results from the inflammatory granulomatous reaction triggered in response to parasite egg deposition in the hepato-splenic system and gastrointestinal tract (Gryseels et al., 2006).

Despite all the research conducted so far, there are no effective vaccines against parasitic diseases, including schistosomiasis. So treatment with drugs is still the only effective way to control the infection (Bethony et al., 2011; McWilliam et al., 2012). Currently, praziquantel (PZQ) is the only drug recommended for the treatment and control of schistosomiasis. PZQ is highly effective against all schistosome species that are known to infect humans and is well-tolerated, making it suitable for mass treatment campaigns. Although it is safe and effective, it is unsettling to have only one drug available to treat a disease in expansion and which affects millions of people, especially since strains of *Schistosoma* are developing low sensitivity and/or resistance to PZQ (Abdul-Ghani et al., 2009). Indeed, *Schistosoma mansoni* isolates with reduced susceptibility to PZQ have already been identified (Melman et al., 2009). Therefore, the widespread use of PZQ in endemic zones with the emergence of drug-resistant *Schistosoma*, in addition to the lack of another effective antischistosomal drug raises urgency in the development of new compounds with a schistosomicidal potential.

Efforts have been undertaken in an attempt to find natural bioactive compounds that can be used in the treatment of parasitic diseases. Among these compounds, the naphthoquinones have emerged as promising subjects of the medicinal chemistry research due to their structural, pharmacological and biological properties. Reactive oxygen species (ROS) generated by these compounds lead to oxidative stress and subsequently to parasite death (Pinto and Castro, 2009).  $\beta$ -Lapachone ( $\beta$ -lap, Fig. 1) (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione) is a lipophilic naphthoquinone, a semi-synthetic analogue to the lapachol compound obtained from the bark of trees of the families *Bigoniaceae* and *Verbenaceae*, which are commonly found in many areas of Brazil (Pinto and Castro, 2009).

$\beta$ -lap is raising huge interest for its powerful therapeutic properties against various diseases, including cancer, diabetes, obesity,

and cardiovascular disease (Dong et al., 2009; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009). There is no doubt that its antineoplastic properties have generated the greatest expectations for their molecule, which is currently under active clinical investigation. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that  $\beta$ -lap inhibits conventional therapy-resistant tumors, particularly the proliferation of slow-cell-cycle neoplasms, causing selective apoptosis in cancer cells related to the cellular activity of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). Phase II human clinical trials for head and neck cancer and leiomyosarcoma treatment have already been successfully completed (Kawecki et al., 2007; Hartner et al., 2007; Siegel et al., 2012).  $\beta$ -lap has been reported to have anti-*Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011), anti-*Plasmodium* (Andrade-Neto et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005), anti-inflammatory (Sitônio et al., 2012), antibacterial (Silva et al., 2009; Lourenço et al., 2011), antifungal (Medeiros et al., 2010) and antiviral properties (Schuerch and Wehrli, 1978; Li et al., 1993).

Regarding the anti-*S. mansoni* properties of the naphthoquinones, Pinto et al. (1997) assessed the topical action of some of their derivatives, including  $\beta$ -lap, on blocking the penetration of cercariae in mice. Naphthoquinone derivatives inhibit aerobic glycolysis in adult *S. mansoni* worms (Edingl et al., 1947), showed *in vitro* schistosomicidal activity against adult worms (Lorsuwannarat et al., 2013; Zhang and Coultas, 2013), molluscicidal activity against the adult snail and snail egg masses of *Biomphalaria glabrata* (the intermediate hosts of *S. mansoni*) and activity against cercariae (*S. mansoni*) (Lima et al., 2002; Camara et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Zhang and Coultas, 2013). The present study investigated the antischistosomal properties of  $\beta$ -lap, providing the first *in vitro* study that demonstrates and describes, using scanning electron microscopy, its ability to cause severe membrane damage in adult *S. mansoni* worms. Furthermore, we demonstrate that the  $\beta$ -lap-induced membrane damage effectively killed adult worms.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Compounds

$\beta$ -lap was synthesized in the Department of Antibiotics of the Universidade Federal de Pernambuco – UFPE from lapachol extracted from the sawdust *Tabebuia avellanedae*, according to the methodology described by Lima et al. (1962). Praziquantel and all other analytical grade or cell culture reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Ethical considerations, animals and infection

After approval by the Animal Experiments Ethics Committee of UFPE (23076.020127/2010-47), ten 30-day old male Swiss mice, weighing  $28 \pm 2$  g, were percutaneously infected (Olivier and Stirewalt, 1952) with about 120 cercariae of *S. mansoni* (BH strain), maintained at the Schistosomiasis Experimental Laboratory of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory – LIKA/UFPE and UFPE's Department of Tropical Medicine. Mice were obtained and kept in the LIKA pound, in a controlled environment ( $20 \pm 2$  °C, 12 h day-light cycle) with free access to food (Labina®/Purina, São Paulo-SP) and water *ad libitum*.

### 2.3. *In vitro* studies with *S. mansoni*

Sixty days after infection the mice were euthanized by cervical sprain and the worms were aseptically recovered by perfusion of the portal system and mesenteric veins with sterile saline (0.9%

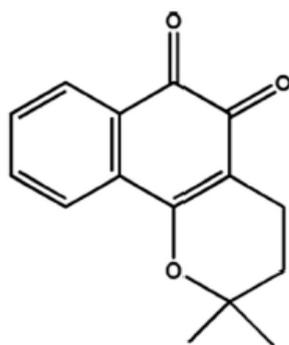


Fig. 1. Chemical structures of  $\beta$ -lapachone.

NaCl w/v) (Smithers and Terry, 1965). Only intact male worms were immediately transferred to an RPMI 1640 medium supplemented with 20 mM HEPES, 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum, being rinsed twice with this medium. Then, the worms were distributed in 24-well culture plates with 2 mL of this medium (two male worms per well) and incubated at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Two hours after incubation, to enable the adaptation of the worms, β-lap was added to a final concentration of 12.5, 25, 50 or 100 µM (from a stock solution of 1 mM in RPMI 1640/1.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)). The control worms were assayed in RPMI 1640 medium with 1.5% DMSO as a negative control group and in 10 µM PZQ as a positive control group. All experiments were performed six times ( $n = 12$  worms by study group) and repeated at least two times.

#### 2.4. Antischistosomal evaluation criteria

##### 2.4.1. Motility and survival

An inverted microscope and a stereomicroscope were used to evaluate the motility and survival of worms monitored at 3, 6, 18 and 24 h of incubation. Motility and survival of worms were assessed according to the criteria scored in a viability scale of 0–3 proposed by Horiuchi et al. (2005). The scoring system was as follows: 3, complete body movement; 1.5, partial body movement or immobile but alive; and 0, dead. Treatment was considered lethal whenever no worm movement was observed for more than 2 min.

##### 2.4.2. Viability assay

The viability of *S. mansoni* after treatment was determined by cytotoxicity assay based on the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), according to conditions previously reported by Bertão et al. (2012). Briefly, two male worms were placed in individual wells on 96-wells plates containing 100 µL of MTT (5 mg/mL in phosphate-buffered saline, PBS) and incubated at 37 °C for 30 min. Thereafter, the MTT solution was replaced by 200 µL DMSO, with the purpose of dissolving the purple crystals of formazan, and the optical density measured at 550 nm, in a microplate reader (M680, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Again, as control groups, pairs of *S. mansoni* were incubated in the presence of 1.5% DMSO in RPMI 1640 (negative control), or exposed to 10 µM PZQ (positive control) for the same time intervals and experimental conditions. All experiments were carried out in quadruplicate and repeated at least two times. The significant differences were taken as  $p < 0.05$ . IC<sub>50</sub> was calculated from a dose–response inhibition curve fitted using the level of formazan formation at each drug concentration. IC<sub>50</sub> value was calculated using Prism (Graphpad) computer software.

##### 2.4.3. Scanning electron microscopy

For ultrastructural analysis of β-lap activity against adult *S. mansoni* worms, scanning electron microscopy (SEM) was used. Worms incubated in 50 or 100 µM β-lap for 3, 6, or 18 h were sampled and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 12 h at room temperature (RT). Thereafter, samples were washed in the same buffer and post-fixed with 1% (w/v) OsO<sub>4</sub> in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h at RT. Specimens were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol and then dried with liquid CO<sub>2</sub> in a critical point dryer machine (Hitachi HCP-2, Hitachi, Japan). Treated specimens were mounted on aluminum microscopy stubs and coated with gold particles using a FINE-COAT 1100 ion-sputtering apparatus (JEOL, Tokyo, Japan). Specimens were then observed and photographed using an electron microscope (JEOL-255II, Tokyo, Japan).

##### 2.4.4. Statistical analysis

Numeric data were analyzed with Graphpad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla – CA, USA), and they are expressed as mean standard deviation (SD). Statistical differences were determined by using one-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with Turkey's test for single-step multiple comparisons. The significant differences were taken as  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. β-lap alters motility and viability of adult worms of *S. mansoni*

Table 1 shows the motility score of *S. mansoni*. During all observation intervals (3, 6, 18 and 24 h) the drug-free adult *S. mansoni* worms (negative control group) displayed peristaltic movements and characteristic waves throughout the whole body, suckers in constant movement and occasionally adhering to the bottom of the culture plate (score = 3). PZQ (positive control group) caused immediate loss of motility in worms leaving them clearly shortened. This effect persisted and became stronger with the passing of time, making the worm have a half-moon shape. After 24 h of exposure to PZQ, 83% of the worms has lost movement completely, being then considered dead (score = 0) and 17% showed slight movements of the oral sucker and of the posterior extremity (score = 1.5). β-lap, in the concentrations of 12.5 and 25 µM, did not alter the motility of *S. mansoni* in observation intervals. On the other hand, after 18 h, 83% of worms exposed to 50 µM displayed a reduction in motility with impairment of peristaltic movement and of the adhesion capacity of their suckers to the bottom of the culture plates (score = 1.5), and after 24 h, 67% of the worms were dead (score = 0). When exposed to 100 µM the motility of worms was altered after 6 h of incubation. At this same

**Table 1**

Motility scores for control, and worms treated with praziquantel (PZQ) and β-lapachone (β-lap) at different hours post-incubation.

Groups	Number of worms	Percent of worms (%) in motility scores after incubation											
		3 h			6 h			18 h			24 h		
		3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0
Control	12	100			100			100			100		
PZQ													
10 µM	12	100			100			25	75		17	83	
β-lap													
12.5 µM	12	100			100			100			100		
25 µM	12	100			100			100			100		
50 µM	12	100			75	25		17	83		33	67	
100 µM	12	100			42	58		75	25			100	

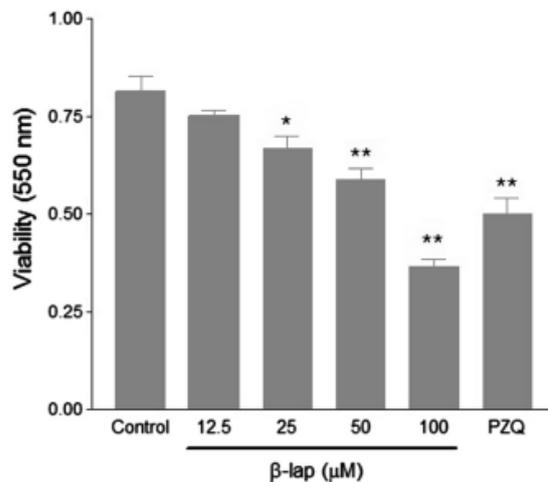
3, movement of whole body; 1.5, movement of only one part of body or immobile but not dead; 0, dead.

concentration, mortality was observed after 18 h and all the worms were observed to have been killed after 24 h.

$\beta$ -lap, in concentrations of 25, 50 and 100  $\mu$ M, reduces the formazan formation meaningfully, in 17.7%, 27.4% and 54.8% respectively, when compared to the negative control group. The concentration of  $\beta$ -lap can reduce 50% formazan formation (IC50) was 61.33  $\mu$ M (IC of 51.91 to 72.47).  $\beta$ -lap, 100  $\mu$ M, was more effective in causing inviability of worms than the concentration of PZQ used (Fig. 2).

### 3.2. Ultrastructural analysis of $\beta$ -lap-induced surface damage in *S. mansoni*

For the ultrastructural analysis we used worms incubated in  $\beta$ -lap concentrations of 50 and 100  $\mu$ M for 3, 6 and 18 h, once throughout this interval these concentrations resulted in alterations in motility and caused death. However, 24-h incubated worms were not analyzed, because most of them were dead.



**Fig. 2.** *In vitro* effects of  $\beta$ -lapachone ( $\beta$ -lap) on the viability of the *S. mansoni* adult worms. Pairs of adult worms were treated with samples in different concentrations for 24 h, and the viability was measured by using the MTT assay and the readout of reduced formazan dye recorded at 550 nm. Worms controls were incubated in RPMI 1640 medium added 1.5% DMSO. Praziquantel (PZQ, 10  $\mu$ M) was used as positive control groups. The viability was expressed as mean  $\pm$  SD of the absorbance values from four experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.001 compared to control.

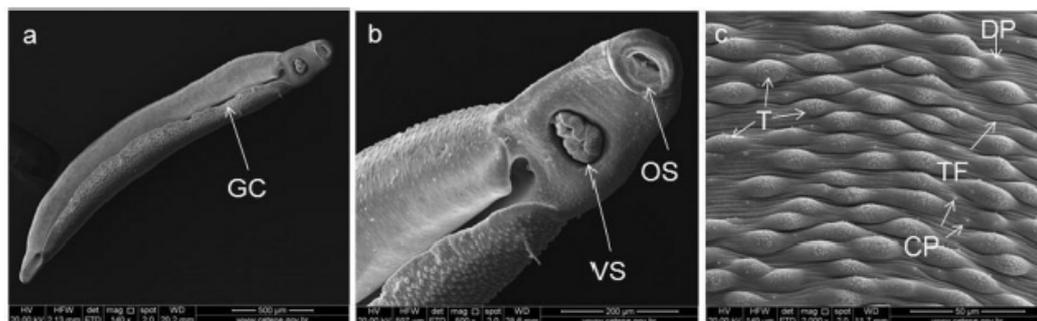
Worms incubated for 18 h in a supplemented RPMI 1640 medium and 1.5% DMSO showed intact surface structure and topography (Fig. 3a–c). The surface of male schistosomes displayed the gynecophoral canal (Fig. 3a), a longitudinal fold in the middle and posterior body that houses the female for the purpose of mating and reproduction. The anterior portion is characterized by an oral and a ventral sucker, smooth and cylindrical tegument with numerous ciliated papillae (Fig. 3b). At a higher magnification of the mid-dorsal region of the worms a large number of tubercles with typical spines were observed; moreover, ciliated papillae, dome-shaped papillae and tegumental parallel-arranged folds were also observed (Fig. 3c).

The ultrastructural changes in adult schistosomes caused by  $\beta$ -lap at concentrations of 50 and 100  $\mu$ M at 3, 6 and 18 h are given in Figs. 4a–i and 5a–i, respectively.  $\beta$ -lap had a clear effect on the musculature of the worms, with dorsoventral curving at a concentration of 50  $\mu$ M (Fig. 4a, d, and g). This effect was more accentuated at a concentration of 100  $\mu$ M, at which the worms were observed to shrink, in time-dependent fashion, taking the form of a corkscrew at 18 h (Fig. 5a, d and g).

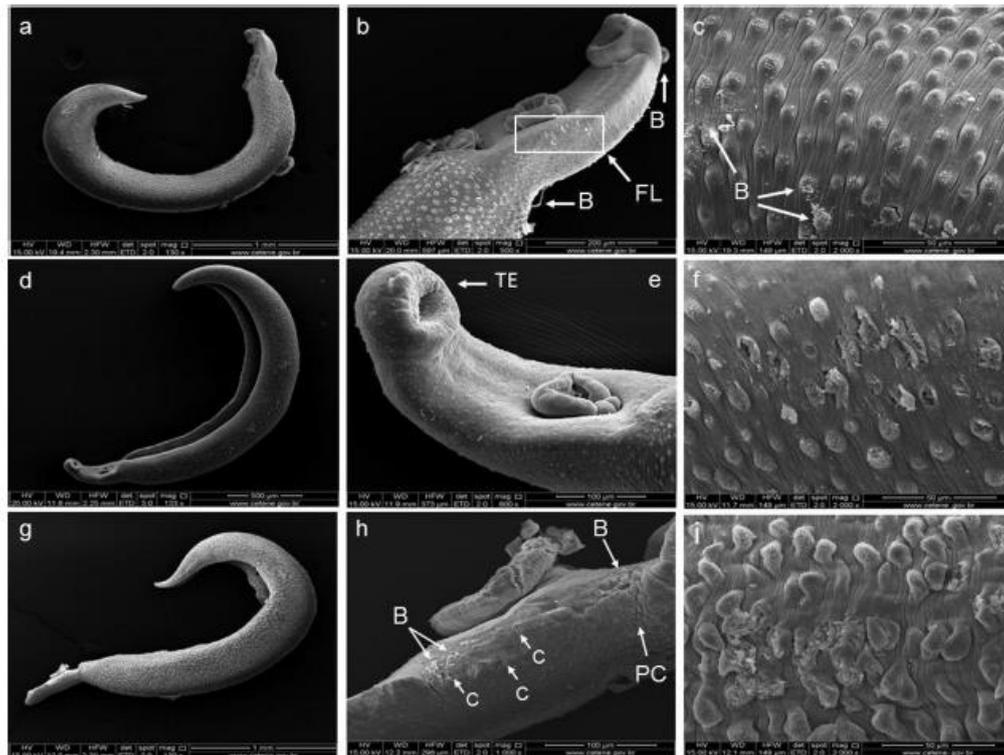
After 3 h of incubation with 50  $\mu$ M of  $\beta$ -lap bubbles were observed and a focal lesion in the tegument in the anterior region of the worms (Fig. 4b) and small bubbles appeared in the surface tegument of the worm forming focal lesions as a mass (Fig. 4c). By 6 h after incubation focal lesions in various parts of the body became more evident. Lesions were observed around the oral sucker (Fig. 4e) and the lateral dorsal portion of the tegument with reduced and eroded tubercle spines (Fig. 4f). By 18 h after incubation there was generalized swelling on the anterior portion and extensive areas of cracking and bubbles (Fig. 4h). Severe alterations in the tegument characterized by swelling, dislocation and erosion of tubercles, the loss of spicules and widening of the parallel-arranged folds were also observed (Fig. 4i).

The most significant tegument changes in the anterior portion of the worms, when incubated with 100  $\mu$ M of  $\beta$ -lap, were intensive evolution of edema and curvature which created a wrinkled surface with obvious furrows developing a fibrous appearance over time (Fig. 5b, e and h). By 3 h after incubation, the tegument had broken tubercles and loss of spicules (Fig. 5c). After 6 h, there were various blisters, some burst and an eroded section of the tegument with exposure of subtegumental tissue (Fig. 5e and f). At 18 h, blistering was observed along with obvious protuberance of the anterior dorsal tegument with the emergence of coalesced folds (Fig. 5h and i).

After 3 h of incubation with 10  $\mu$ M PZQ, an obvious contraction of longitudinal muscles occurred; the worms were curved and shortened in appearance (Fig. 6a). The effect of PZQ after 6 h of



**Fig. 3.** (a–c) Scanning electron microscopy (SEM) of the tegument of the adult male *S. mansoni* worms from the negative control group. Parasites incubated in maintenance medium for 18 h; (a, 140 $\times$ ) showing gynecophoral channel (GC); (b, 500 $\times$ ) anterior portions showing oral sucker or acetabulum (OS) and ventral sucker (VS); (c, 2000 $\times$ ) dorsal region where tubercles (T), ciliated papillae (CP), dome-shaped papillae (DP) and tegumental parallel-arranged folds (TF) are visible.



**Fig. 4.** (a–i) SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 50  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -lap. At 3 h (a, 130 $\times$ ) showing dorsoventral curvature; (b, 500 $\times$ ) enlarged view of a showing the anterior region with blobs and focal lesion on the tegument; (c, 2000 $\times$ ) dorsal surface showing a few small blobs as a mass (B); at 6 h (d, 133 $\times$ ) worms dorsoventrally curved as in a; (e, 800 $\times$ ) enlarged view of anterior portion of d showing erosion of tegument (TE) around the oral sucker; (f, 2000 $\times$ ) lesions of the dorsal lateral tegument showing erosion of tubercles; at 18 h (g, 130 $\times$ ) showing worm with more dorsoventral curvature than in a and d; (h, 1000 $\times$ ) the anterior part of the tegument swollen, deep coalesced folds (PC) and areas of cracking (C) and blistering (B); (i, 2000 $\times$ ) tegument tubercles eroded and loss of spicules.

incubation was marked by the presence of tubercles alongside loss of spicules, blistering over the surface of the tegument and the beginning of the appearance of holes on the tegument (Fig. 6b and c).

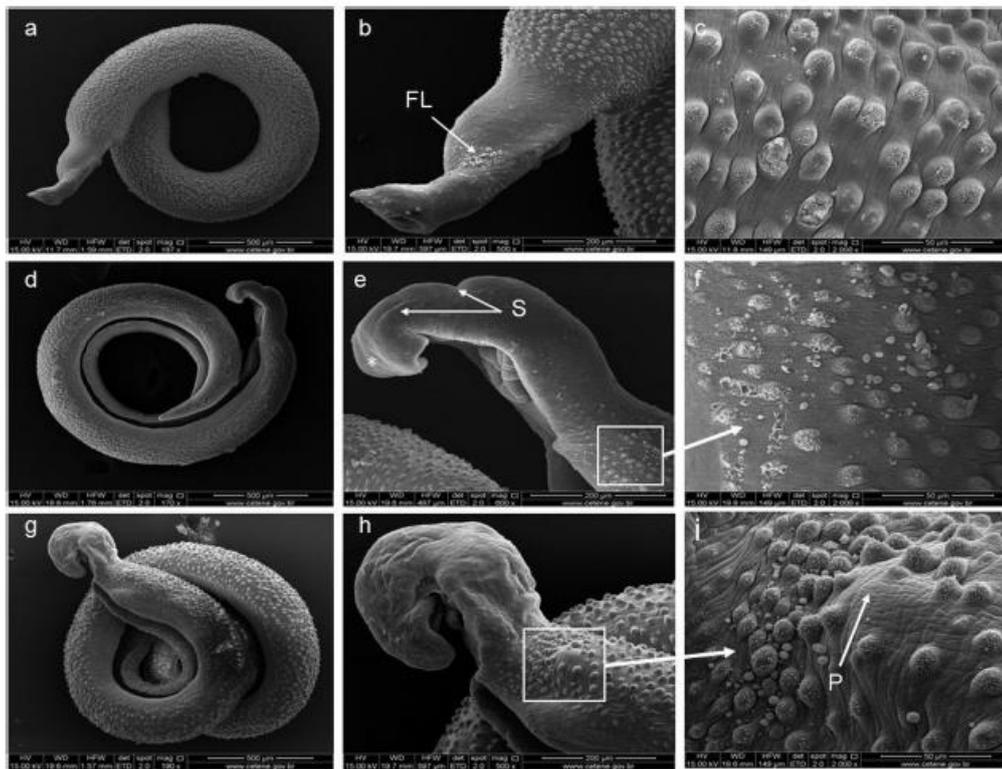
#### 4. Discussion

The tegument of the *S. mansoni* is an important target for the action of drugs, since it makes direct contact with the compounds. The tegument is a barrier that isolates it from the external environment and ensures maintenance of vital functions. It is responsible for absorbing nutrients, metabolizing lipids and cholesterol, tissue proliferation and repair and the selective absorption of drugs (Krautz-Peterson et al., 2007; Faghiri and Skelly, 2009; Pereira et al., 2011). We hypothesized that  $\beta$ -lap may exhibit schistosomicidal properties by interfering in the tegument structural integrity. To test this hypothesis, we first established the concentration of  $\beta$ -lap that is capable of altering the motility, causing death and derail cells in the period of a 24 h exposure *in vitro*. Based on these criteria, the concentrations of 50 and 100  $\mu\text{M}$  were used to study, through SEM, alterations in the surface of the integument of adult male worms. So, we contribute with the first study that report the anthelmintic effect of  $\beta$ -lap on *S. mansoni* adult worms.

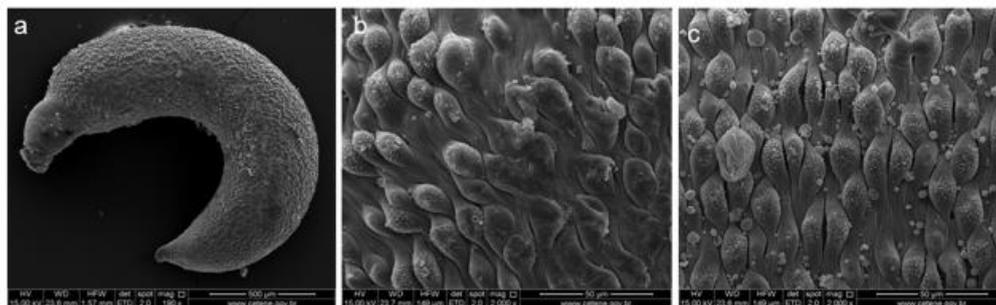
Surface membrane damage and the number of dead parasites were concentration- and time-dependent. Alterations in motility began after 6 h of incubation and total mortality of worms

occurred 24 h after treatment at a dose of 100  $\mu\text{M}$ . During this same time interval, 67% of the worms died at a 50  $\mu\text{M}$  concentration. The cytotoxic activity of  $\beta$ -lap stands out over a wide range of human tumor cells (Li et al., 2000; Kawecky et al., 2007; Hartner et al., 2007; Dong et al., 2009; Siegel et al., 2012) and also on *T. cruzi* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Pinto and Castro, 2009; Ferreira et al., 2011). However, no cytotoxic effects were observed on human peripheral blood mononuclear cells (Li et al., 2000). According to Miao et al. (2008),  $\beta$ -lap rapidly disappeared from the whole blood within 30 min, however was shown to be stable in plasma for 2 h. Other species, including mouse, rat, dog, and monkey showed similar results. The rapid disappearance of  $\beta$ -lap in whole blood could include sequestration of  $\beta$ -lap in red blood cells, covalent binding of  $\beta$ -lap (and/or its metabolites) to blood components, metabolism by enzymes in blood, or a combination of the above processes.

$\beta$ -lap caused paralysis and strong dorsoventral curvature in addition to progressive surface membrane damage, characterized by peeling, spine reduction and erosion, blister formation and rupture, the emergence of holes and lesions of a fibrous appearance, but the worms were not shortened like those exposed to PZQ (Figs. 4g  $\times$  5g  $\times$  6a). The tegument changes induced by  $\beta$ -lap are similar to those demonstrated in adult *Schistosoma mekongi* treated with artesunate (Jiraungkoorskul et al., 2005), in *Schistosoma haematobium* treated with combined atorvastatin and medroxyprogesterone acetate (Soliman and Ibrahim, 2005), and in *S. mansoni*



**Fig. 5.** (a–i) SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 100  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -lap. (a, 187 $\times$ ) (d, 170 $\times$ ) (g, 190 $\times$ ) the worms roll up to form, in g, a corkscrew shape. At 3 h (a, 187 $\times$ ) the worm rolled up dorsoventrally; (b, 500 $\times$ ) enlarged view of anterior portion of a showing swollen tegument and focal lesion (FL); (c, 2000 $\times$ ) damaged tubercles with loss of spicules and exposure of subtegumental tissue; at 6 h (d, 170 $\times$ ) worm showing more intensive contraction than in a; (e, 600 $\times$ ) enlarged view of d showing contracted anterior portion (\*), swollen tegument, presence of furrows (S) and damage to the lateral dorsal part of the tegument; (f, 2000 $\times$ ) enlarged view of e showing subtegumental layer and presence of blistering; at 18 h (g, 190 $\times$ ) worm severely curved dorsoventrally; (h, 500 $\times$ ) enlarged view of anterior portion of g severely contracted with swollen tegument showing deep furrows; (i, 2000 $\times$ ) enlarged view of h showing lateral dorsal tegument with presence of various blisters (B) and area with clear protuberance (P).



**Fig. 6.** (a–c) SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 10  $\mu\text{M}$  of PZQ. At 3 h (a, 190 $\times$ ) showing worm severely contracted and shortened; at 6 h (b, 2000 $\times$ ) tubercles with loss of spicules and emergence of holes in tegument; (c, 2000 $\times$ ) blisters over surface of tegument juxtaposed with tubercles.

treated with artemether (Xiao et al., 1995) and PZQ (Xiao et al., 1995, 2000; Lorsuwanarat et al., 2013).

Recently, 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, known as plumbagin (PB) has proved to be active against adult *S. mansoni* worms, altering motility, mortality and the tegument. The effects of PB were dose- and time-dependent and the surface of the male parasites appeared to be more greatly damaged by the drugs than

that of females (Lorsuwanarat et al., 2013; Zhang and Coultas, 2013). Through SEM, Lorsuwanarat et al. (2013) describe that the alterations in the tegument brought about by PB include edema, cracking and a wrinkled surface with furrows that become apparently fibrous over time. In addition, Zhang and Coultas (2013) describe adult male worms contracted and curved dorsoventrally, with disintegration of tubercles, decrease in the number of spines

and emergence of holes on the surface when incubated in the presence of PB. These alterations are similar to those observed in our study using  $\beta$ -lap (Figs. 4h and 5e and h). Moreover, PB caused paralysis and muscle contractions, which led to the splitting of the head from the tail of the *S. mansoni* cercariae.

Other naphthoquinones, including  $\beta$ -lap, have been shown to be active against other phases in the development of *S. mansoni*. Pinto et al. (1997) evaluated 23 naphthoquinone derivatives that topically inhibit the penetration of the *S. mansoni* cercariae. From the derivatives studied, 15 blocked the permeation and the group of animals exposed to  $\beta$ -lap resulted in 100% blockage, meaning that no single worm was recovered. Various studies have pointed out the importance of topical formulations that are able to block the penetration of cercariae, since *S. mansoni* infection depends on penetration and adequate adaptation within the first 4–5 days in strata of the definitive host's skin (Pinto et al., 1997; Kasny et al., 2007; Haas et al., 2008). Naphthoquinone derivatives inhibit aerobic glycolysis in adult *S. mansoni* worms (Edingl et al., 1947) and are also active against *S. mansoni*'s intermediate host. These compounds kill adult snails and the spawn of *B. glabrata* (Lima et al., 2002; Camara et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Zhang and Coultas, 2013).

Despite extensive studies, the exact action mechanism of PZQ is still not fully understood. However, it is known that PZQ first causes rapid inflow of calcium, which induces spasmodic contraction of worm musculature. Then the tegument undergoes major destruction resulting in the death of the parasites Doenhoff et al., 2008, 2009. In the case of  $\beta$ -lap exposure, the progressive surface membrane damage does not appear to be directly related to the inflow of calcium, since  $\beta$ -lap inhibits the inflow of  $Ca^{2+}$  and causes efflux of these ions. It is known that the futile cycling of  $\beta$ -lap catalyzed by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) using NADH or NADPH as an electron source leads to progressive NADH or NADPH depletion, which in turn induces massive  $Ca^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum to the cytosol, causing apoptosis (Tagliarino et al., 2001; Bentle et al., 2006).

$\beta$ -lap, like other naphthoquinones, affects the mitochondrial functioning by redox cycling-mediated oxidation (Witte et al., 2004), inducing internucleosomal fragmentation of DNA, release of cytochrome c and activation of caspase-3 (Li et al., 1999; Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008). The enzymatic reduction in situ (redox cycle) leads to massive reactive oxygen species (ROS) production, inducing cytotoxicity and tissue injuries (Park et al., 2011). The increase in ROS and  $H_2O_2$  alters the antioxidant defenses of *S. mansoni*, by causing depletion of the glutathione reserve by oxidizing reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), resulting in the proteic disorganization and lipid peroxidation, which would cause the death of the worm (Azza et al., 2005; Kuntz et al., 2007; Seif el-Din et al., 2011). Despite several studies on  $\beta$ -lap's action mechanism in different experimental models, information about their schistosomicidal activity is still not understood. However, as numerous mitochondria are distributed throughout the tegument of *S. mansoni* and they are the main target of the damages caused by ROS (Mei et al., 1996), we suggest that this is a possible route of action  $\beta$ -lap on the tegument of *S. mansoni* in the same way as suggested by Loruswannarat et al. (2013) to study the naphthoquinone PB.

New drugs with potential anti-*S. mansoni* properties are being identified every day and often serve as models for possible molecular alterations that result in more effective and less toxic compounds. The present study is the first to present *S. mansoni* as a new target for  $\beta$ -lap. We have demonstrated the susceptibility of adult male worms of the BH strain. Studies on adult female worms should be performed, as well as detailed investigation will be required to understand the molecular mechanisms underlying

the antischistosomal activity of  $\beta$ -lap and to establish this drug as part of the available arsenal of schistosomicidal compounds.

#### Acknowledgment

This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### References

- Abdul-Ghani, R.A., Loutfy, N., Hassan, A., 2009. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol. Res.* 105, 899–906.
- Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O.F., Silva-Filho, J.F., Silva, M.J., Pinto, M.C.F.R., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol,  $\beta$ -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1145–1149.
- Azza, M.M., Nadia, M.M., Sohair, S.M., 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 205–211.
- Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Bey, E.A., Spitz, D.R., Boothman, D.A., 2006. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281, 33684–33696.
- Bertão, H.G., Silva, R.A.R., Padilha, R.J.R., Albuquerque, M.C.P.A., Rádís-Baptista, Gandhi, 2012. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol. Res.* 110, 2465–2473.
- Bethony, J.M., Cole, R.N., Guo, X., Kambawi, S., Lightowler, M.W., Loukas, A., Petri, W., Reed, S., Valenzuela, J.G., Hotez, P.J., 2011. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol. Rev.* 239, 237–270.
- Camara, C.A., Silva, T.M.S., Silva, T.G., Martins, R.M., Barbosa, T.P., Pinto, A.C., Vargas, M.D., 2008. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone and derivatives. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80, 329–334.
- Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659–667.
- Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattocchia, L., Botros, S., Coles, G., Tchuente, T.L.A., Mbaye, A., Engels, D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825–1835.
- Dong, Y., Chin, S.F., Blanco, E., Bey, E.A., Kabbani, W., Xie, X.J., Bornmann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J., 2009. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 15, 131–139.
- Edingl, E., Tersan, A., Waite, J.F., 1947. Effect of 2-methyl-1,4-naphthoquinone on glycolysis of *Schistosoma mansoni*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 64, 111–113.
- Faghiri, Z., Skelly, P.J., 2009. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J.* 23, 2780–2789.
- Ferreira, S.B., Salomão, K., Silva, F.C., Pinto, A.V., Kaiser, C.R., Pinto, A.C., Ferreira, V.F., Castro, S.I., 2011. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3071–3077.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106–1118.
- Haas, W., Haeblerlein, S., Behring, S., Schönamsgruber, E., Zopelli, E., 2008. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. *Exp. Parasitol.* 120, 94–97.
- Hartner, L.P., Rosen, L., Hensley, M., Mendelson, D., Staddon, A.P., Chow, W., Kovalyov, O., Ruka, W., Skladowski, K., Jagiello-Gruszfeld, A., Byakhov, M., 2007. Phase 2 dose multicenter, open-label study of ARQ 501, a checkpoint activator, in adult patients with persistent, recurrent or metastatic leiomyosarcoma (LMS). *J. Clin. Oncol.* 25, 20521.
- Horiuchi, A., Satou, T., Akao, N., Koike, K., Fujita, K., Nikaido, T., 2005. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Ver. Parasitol.* 129, 83–87.
- Hwang, J.H., Kim, D.W., Jo, E.J., Kim, Y.K., Jo, Y.S., Park, J.H., Yoo, S.K., Park, M.K., Kwak, T.H., Kho, Y.L., Han, J., Choi, H.S., Lee, S.H., Kim, J.M., Lee, I., Kyung, T., Jang, C., Chung, J., Kweon, G.R., Shong, M., 2009. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* 58, 965–974.
- Jiraungkoorskul, W., Sahaphong, S., Sobhon, P., Rengrojpitak, S., Kangwanrangsan, N., 2005. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol. Int.* 54, 177–183.
- Kasny, M., Mikes, L., Dalton, J.P., Mountford, A.P., Horak, P., 2007. Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599–1609.
- Kawecki, A., Adkins, D.R., Cunningham, C.C., Vokes, E., Yagovane, D.M., Dombal, G., Koralewski, P., Hotko, Y., Vladimirov, V., 2007. A phase II study of ARQ 501 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 25, 16509.

- Kim, S.Y., Jeong, N.H., Oh, C.J., Choi, Y.K., Lee, H.J., Kim, H.J., Kim, J.Y., Hwang, J.H., Tadi, S., Yim, Y.H., Lee, K.U., Park, K.G., Huh, S., Min, K.N., Jeong, K.H., Park, M.G., Kwak, T.H., Kwon, G.R., Inukai, K., Shong, M., Lee, L.K., 2009. Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 prevents arterial restenosis by suppressing vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* 104, 842–850.
- Krautz-Peterson, G., Camargo, S., Huggel, K., Verrey, F., Shoemaker, C.B., Skelly, P.J., 2007. Amino acid transport in schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPM1hc. *J. Biol. Chem.* 282, 21767–21775.
- Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., Amér, E.S.J., Williams, D.L., 2007. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Med.* 4, 1–6.
- Li, Y., Li, C.J., Yu, D., Pardee, A.B., 2000. Potent induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Mol. Med.* 6, 1008–1015.
- Li, C.J., Li, Y.Z., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23, 13369–13374.
- Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S., Pardee, A.B., 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1839–1842.
- Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Santana, A.E.G., 2002. Toxicity of lapachol and isalopachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop.* 83, 43–47.
- Lima, O.G., D'Albuquerque, L.C., Lima, C.G., Maia, M.H.D., 1962. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Antibiót.* 4, 3–17.
- Lorsuwanarat, N., Saowakorn, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 133, 18–27.
- Loureço, A.L., Abreu, P.A., Leal, B., da Silva Júnior, E.N., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Souza, A.M., Novais, J.S., Paiva, M.B., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Ferreira, V.F., Castro, H.C., 2011. Identification of non- $\beta$ -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. *Curr. Microbiol.* 62, 684–689.
- McWilliam, H.E., Driguez, P., Piedrafita, D., McManus, D.P., Meeusen, E.N., 2012. Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. *Parasite Immunol.* 34, 276–284.
- Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, A.S., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone  $\beta$ -lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 345–349.
- Mei, H., Thakur, A., Schwartz, J., LoVerde, P.T., 1996. Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64, 4299–4306.
- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M.S., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 1–8.
- Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Pinto, A.V., Soares, M.J., Castro, S.L., 2007. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from  $\beta$ -lapachone. *Parasitol. Res.* 101, 895–905.
- Miao, Xiu-Sheng, Song, P., Savage, R.E., Zhong, C., Yang Rui-Yang, Kizer, D., Wu, H., Volkova, E., Ashwell, M.A., Supko, J.G., He, X., Chan, T.C.K., 2008. Identification of the in vitro metabolites of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501;  $\beta$ -lapachone) in whole blood. *Drug Metab. Dispos.* 36, 641–648.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 38, 19–23.
- Park, E.J., Choi, K.S., Kwon, T.K., 2011.  $\beta$ -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. *Chem. Biol. Interact.* 189, 37–44.
- Pereira, A.S., Padilha, R.J., Lima-Filho, J.L., Chaves, M.E., 2011. Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 109, 1395–1402.
- Pérez-sacau, E., Estévez-braun, A., Ravelo, A.G., Gutiérrez, Y.D., Giménez, T.A., 2005. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and  $\beta$ -lapachone. *Chem. Biodivers.* 2, 264–274.
- Pinto, A.V., Castro, S.L., 2009. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules* 4, 4570–4590.
- Pinto, A.V., Pinto, M.C.R., Gilbert, B., Pellegrino, J., Mello, R.T., 1997. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 133–135.
- Ribeiro, K.A.L., Carvalho, C.M., Molina, M.T., Lima, E.P., Lópezmontero, E., Reys, J.R.M., Oliveira, M.B.F., Pinto, A.V., Sant'ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2009. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 111, 44–50.
- Salas, C., Tapia, R.A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Maya, J.D., Morello, A., 2008. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 668–674.
- Schuerch, A.R., Wehrli, W., 1978.  $\beta$ -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- $\alpha$ . *Eur. J. Biochem.* 84, 197–205.
- Seif el-Din, S.H., Al-Hroob, A.M., Ebeid, F.A., 2011. *Schistosoma mansoni*: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. *Exp. Parasitol.* 128, 230–235.
- Siegel, D., Yan, C., Ross, D., 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinines. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1033–1040.
- Silva, J.L., Mesquita, A.R.C., Ximenes, E.A., 2009. In vitro synergic effect of  $\beta$ -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 580–582.
- Sitônio, M.M., Júnior, C.H.R.C., Campos, I.A., Silva, J.B.N.F., Lima, M.C.A., Góes, A.J.S., Maia, M.B.S., Rolim, P.J.N., Silva, T.G., 2012. Anti-inflammatory and anti-arthritis activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione ( $\beta$ -lapachone). *Inflamm. Res.* 62, 107–113.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Soliman, M.F., Ibrahim, M.M., 2005. Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Trop.* 93, 1–9.
- Tagliarino, C., Pink, J.J., Dubyak, G.R., Nieminen, A.L., Boothman, D.A., 2001. Calcium is a key molecule in  $\beta$ -lapachone-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* 276, 19150–19159.
- Utzinger, J., Raso, G., Brooker, S., Savigny, D., Tanner, M., Ornberg, N., Singer, B.H., N'goran, E.K., 2009. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology* 139, 1859–1874.
- Witte, N.V., Stoppani, A.O., Dubin, M., 2004. 2-Phenyl-beta-lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 129–135.
- World Health Organization - WHO, 2012. Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Disease: A Roadmap for Implementation. Available at: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/NTD\\_RoadMap\\_2012\\_Fullversion.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf)>.
- Xiao, S., Shen, B., Chollet, J., Utzinger, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *J. Parasitol.* 86, 1125–1132.
- Xiao, S.H., You, J.Q., Yang, Y.Q., Wang, C.Z., 1995. Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 26, 306–318.
- Zhang, S., Coultas, K.A., 2013. Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 3, 28–34.

## Apêndice 2 - Artigo Publicado na Revista *Phytomedicine*

Phytomedicine 21 (2014) 261–267



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: [www.elsevier.de/phymed](http://www.elsevier.de/phymed)



### $\beta$ -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice



André de Lima Aires<sup>a,b</sup>, Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes<sup>c</sup>,  
Vanessa Xavier Barbosa<sup>c</sup>, Alexandre José da Silva Góes<sup>c</sup>, Valdênia Maria Oliveira Souza<sup>a</sup>,  
Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Ciências Biológicas – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 24 May 2013

Received in revised form 28 June 2013

Accepted 9 August 2013

##### Keywords:

$\beta$ -Lapachone

Schistosomicidal

*Schistosoma mansoni*

In vivo

Granuloma

#### ABSTRACT

The activity of  $\beta$ -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione,  $\beta$ -lap) against different stages of *Schistosoma mansoni* was investigated in mice. Mice infected with 50 cercariae (BH strain) were intraperitoneally treated at a dose of 50 mg/kg for 5 consecutive days, starting on the 1st, 14th, 28th and 45th days after infection, to evaluate the effect of  $\beta$ -lap on skin schistosomula, lung schistosomula, young worms (before oviposition) and adult worms (after oviposition), respectively. All animals were euthanized 60 days after infection.  $\beta$ -Lap significantly reduced ( $p < 0.001$ ) the number of worms in 29.78%, 37.2%, 24.2% and 40.22% when administered during the phases of skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms, respectively. Significant reduction was also achieved in terms of female burden. In all groups, there was significant reduction in the number of eggs and granulomas in the hepatic tissue. When the intervention was performed during the phase of adult worms,  $\beta$ -lap reduced the size of hepatic granulomas and changed the oogram pattern, lowering the percentage of immature eggs and increasing the percentage of mature and dead eggs. Our data indicate that  $\beta$ -lap has moderate antischistosomal properties. Its molecule may also be used as a prototype for synthesis of new naphthoquinone derivatives with potential schistosomicidal properties. Further studies with different formulations containing  $\beta$ -lap are needed to clearly establish the best dose and route of administration and its mechanism of action against schistosomes.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

#### Introduction

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease caused by worms of the genus *Schistosoma*. The infection is potentially life-threatening with severe pathological manifestations in the hepato-splenic system and gastrointestinal tract (Neghina et al., 2009). It is included on the World Health Organization (WHO)'s list of neglected diseases and has a significant economic and social impact. It is estimated that 779 million people are at constant risk of infection and 207 million are infected, of whom 120 million are symptomatic, 20 million develop the chronic form and more than 500,000 die each year (Steinmann et al., 2006).

Chemotherapy is the only immediate measure for reducing the incidence and prevalence of schistosomiasis in endemic areas, since, to date, there is no satisfactory vaccine against the parasite. At present, praziquantel (PZQ) is the only drug recommended for the treatment and control of schistosomiasis, although it is not active against schistosomula and young worms and does not prevent reinfection (Sabah et al., 1986; Doenhoff et al., 2000). More than 100 million people are currently being treated with PZQ. The huge demand for its use is confirmed not only by the high prevalence of schistosomiasis, but by countless cases of reinfection which are portrayed in an annual or semiannual basis. This leads to the development of resistant parasites and consequently to a collapse in the treatment of the disease. This has encouraged us to contribute with new studies to preserve PZQ in the treatment of schistosomiasis.

$\beta$ -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione,  $\beta$ -lap, Fig. 1) is a bioactive quinone, originally isolated from the heartwood of trees of the Bignoniaceae family (*Tabebuia* sp.). It can also be found in other families such as Verbenaceae, Proteaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae

\* Corresponding author at: Departamento de Medicina Tropical and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8484; fax: +55 81 2126 8485.

E-mail address: [jcmonica@globo.com](mailto:jcmonica@globo.com) (M.C.P.d.A. Albuquerque).

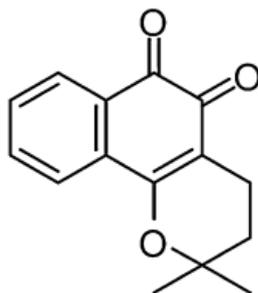


Fig. 1. Chemical structure of  $\beta$ -lapachone.

and Malvaceae. The great interest in its study, including the elucidation of mechanisms of action of compounds with quinoidal structure is due to their multiple biological targets and their widespread presence in nature (Hussain et al., 2007).

$\beta$ -Lap is active against bacteria (Lourenço et al., 2011; Kenneth et al., 2012; Silva et al., 2009), viruses (Schuerch and Wehrli, 1978; Li et al., 1993), fungus (Medeiros et al., 2010) and the protozoa *Plasmodium* (Andrade-Neto et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005) and *Trypanosoma* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011). In addition to these effects, other bioactivities of  $\beta$ -lap have been reported, such as the anti-inflammatory activity (Sitônio et al., 2012) and especially the powerful anticancer activity, displaying selective activity against various human cancers (Bey et al., 2007; Moon et al., 2010).

The aim of this study was to describe the effect of  $\beta$ -lap in the developmental stages of *Schistosoma mansoni*, based on parasitological and histopathological criteria in a model using mice. In a bibliographical survey, we found no studies on *in vivo* antischistosomal activities of  $\beta$ -lap, these activities being described here for the first time.

## Materials and methods

### Animals

Female Swiss albino mice, 30-day old, weight  $\sim$ 30 g, were obtained and kept in the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami pound, in a controlled environment (temperature between  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 h daylight cycle), having free access to food (Labina<sup>®</sup>/Purina, São Paulo, SP) and water *ad libitum*. All animal experiments were conducted after the approval from the Animal Experiments Ethics Committee of the UFPE Protocol number 23076.020127/2010-47.

### Infection of mice

The mice were infected with the BH strain of *S. mansoni* maintained at the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami of the Federal University of Pernambuco (UFPE – Recife, PE, Brazil), through successive passages in *Biomphalaria glabrata* and Swiss mice. Cercariae from at least 80 shedding *B. glabrata* snails were used to infect the mice. Each mouse was percutaneously infected with 50 cercariae (Olivier and Stirewalt 1952).

### Drugs

$\beta$ -Lap was synthesized in the Department of Antibiotics of the UFPE from lapachol extracted from the sawdust *Tabebuia avellanae*, according to the methodology described by Lima et al.

(1962).  $\beta$ -Lap was solubilized in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 1% Tween 80 in saline solution. Praziquantel (PZQ) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was suspended in 2% Cremophor EL in saline solution.

### Treatment protocol

While planning the experimental design two criteria were taken into account: (1) the onset of  $\beta$ -lap administration and (2) the dose. The time of administration was used to take into account the schistosome life cycle stages, because the time of exposure of schistosomes to a drug may often be of greater importance than the dose applied (Gonnert and Andrews, 1977). The mice were randomly allocated into four experiment groups (ten mice each) according to initiation of treatment. Treatment was started on the 1st, 14th, 28th and 45th day after infection to evaluate the following stages of development: skin schistosomula, lung schistosomula, young worms (stages before oviposition) and adult worms (stage after oviposition) (Fig. 2).

$\beta$ -Lap was injected intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg of body weight/day. The injections were administered during five consecutive days and freshly prepared before administration. The dose used was based on experiments that describe the activities of  $\beta$ -lap against other parasites (Andrade-Neto et al., 2004).

Each experimental group treated with the  $\beta$ -lap was accompanied by an untreated infected control group (ten mice each) that received the drug vehicle only. A positive control group was established to receive the reference drug PZQ, administered in the dose of 50 mg/kg/day, orally through gavage, from the 45th until the 49th day after infection. This guideline ensures high parasitological cure rate within the period in which the infection presents adult worms, but there is no indication in periods in which the infection presents immature worms. For these stages, there is no drug available to treat schistosomiasis (Sabah et al., 1986; Doenhoff et al., 2000).

All animals were euthanized by cervical dislocation 60 days after infection.

### Parasitological parameters

#### Recovery of worms

The worms were recovered from the hepatic portal system and mesenteric vessels through the technique described by Smithers and Terry (1965). The percentage reduction in the number of worms after treatment was calculated as follows: % reduction =  $C - V/C \times 100$ , where  $C$  = the mean number of parasites recovered from infected untreated animals and  $V$  = the mean number of parasites recovered from treated animals.

#### Oogram pattern

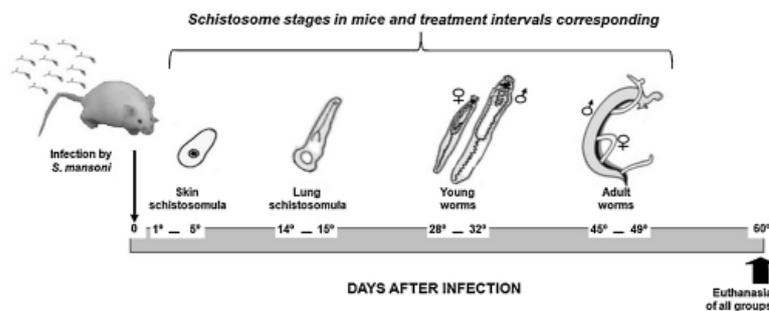
Fragments from different sites in the small intestine were removed and used to evaluate the development and maturation of the *S. mansoni* eggs, as described by Pellegrino et al. (1962).

#### Ova count in hepatic tissue

To estimate the number of eggs per gram of hepatic tissue, a sample of the liver with about 0.3 g was removed from the central remaining part of the right lobe of each animal and processed separately using the potassium hydroxide (KOH) digestion technique (Cheever, 1968).

#### Hepatic histopathology and granuloma measurement

For each perfused mouse, a sample of the liver was removed from the central part of the left lateral lobe and fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin blocks to obtain thin histological sections ( $5 \mu\text{m}$ ) that were stained with hematoxylin and eosin. Ten random fields per histological sample were used to count



**Fig. 2.** Design of the experiment. The mice were infected with *S. mansoni* (50 cercariae per mouse) on day 0 (†). The  $\beta$ -lapachone treatment in the dose of 50 mg/kg/day was started on the 1st, 14th, 28th and 45th days after infection. The administration was done intraperitoneally for five consecutive days. All animals were euthanized 60 days after infection (†).

the average number of granulomas which were evaluated histologically using light microscopy. Twenty granulomas of each animal containing a single central egg were randomly selected and used to determine the average diameter of granulomas by measuring two perpendicular diameters transmiracidial at the average level of the egg (Phillips et al., 1977). Images were obtained by using an optical microscope connected to a digital camera and a computer system (Motic Images Plus 2.0 ML™). All analyses were performed by double-blind observers.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 3.02. Data were expressed as the mean  $\pm$  SD. All variables were compared using Student's *t*-test. In all cases, results were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

#### Effect of $\beta$ -lap on different development stages of *S. mansoni*

Among the control groups used in the study, there were no significant differences in the total number of worms (overall average,  $22.79 \pm 2.93$ ;  $p = 0.64$ ) and female worms (overall average,  $10.09$ ;  $p = 0.91$ ), showing uniformity on the infection.

The administration of  $\beta$ -lap in mice harboring different development stages of *S. mansoni* – skin schistosomule (1 day after infection), lung schistosomula (14 days after infection), young worms (28 days after infection) and adult worms (45 days after infection), significantly reduced ( $p < 0.001$ ) the overall worm burden by 29.78%, 37.2%, 24.2% and 40.22% respectively, when compared to the control group. A similar percentage reduction was also achieved in the recovery of female worms for the same schemes of therapeutic intervention. When analyzing the number of eggs per gram of hepatic tissue,  $\beta$ -lap induced significant reductions ( $p < 0.001$ ) of 32.71%, 42.07%, 34.64% and 48.01% were achieved when the drug was administered on the 1st, 14th, 28th and 45th day after infection, respectively. The PZQ dose used, in 45-day-infected mice, showed high percentage in reducing the overall rate of worm burden (94.66%) and worm burden females (93.66%) and a reduction of 65.78% in the hepatic tissue egg load (Table 1).

In all groups treated with  $\beta$ -lap, intestinal tissue samples exhibited *S. mansoni* eggs at all development stages as was seen in the control groups (data not shown). However, during the adult worms stage, compared to control,  $\beta$ -lap and PZQ significantly reduced the percentage of immature eggs in 20% and reaching zero percent, respectively. Even at this stage, both  $\beta$ -lap as PZQ significantly

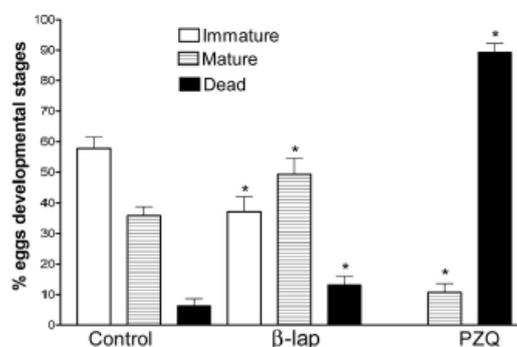
increased the percentage of dead eggs, however this effect was more evident with PZQ. Regarding mature eggs  $\beta$ -lap increased in 13.2% while PZQ reduced in 25.18% (Fig. 3).

#### Effect of $\beta$ -lap on hepatic schistosomotic granuloma

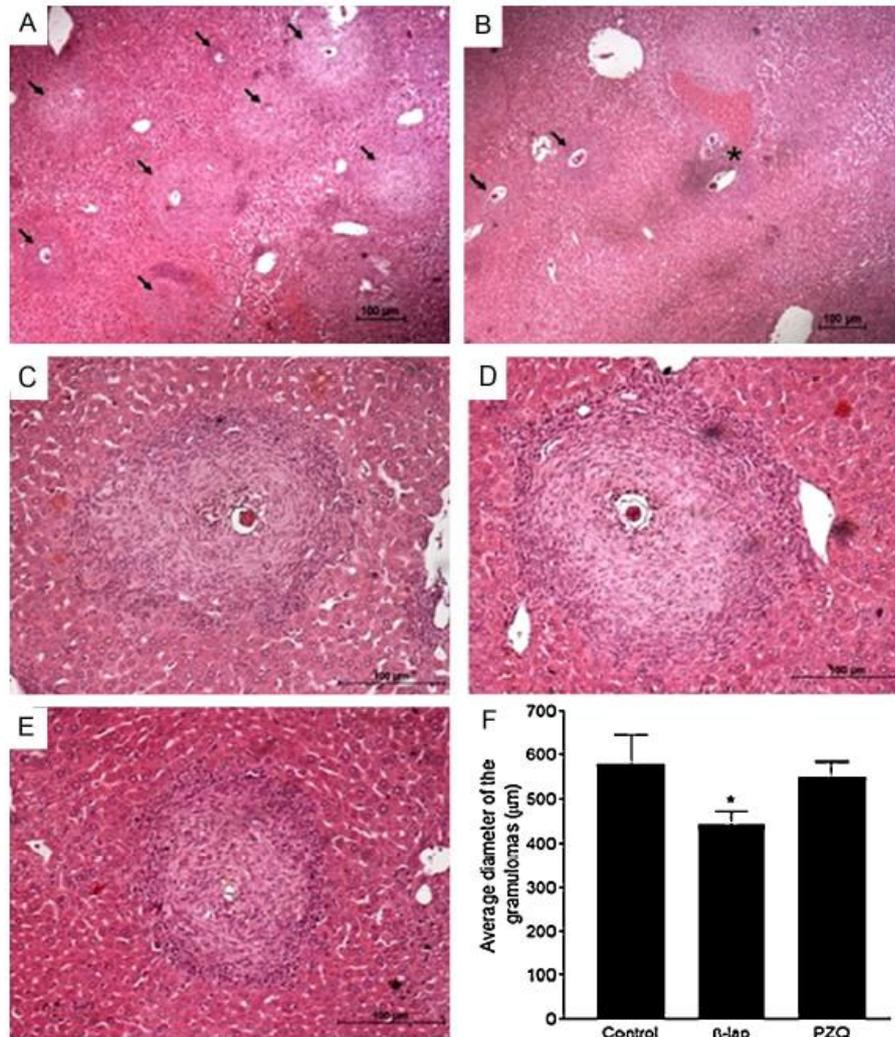
The hepatic lobular architecture was found to be preserved in both control and treated mice. Histopathological examination of the hepatic tissue sections in control groups exhibited typical inflammatory granulomatous reaction in the hepatic parenchyma and portal tract with an infiltration of eosinophils, polymorphonuclear neutrophils, in addition to a few macrophages and lymphocytes surrounding the egg (Fig. 4A and D). This profile of inflammatory reaction was also seen in the groups treated with  $\beta$ -lap during immature stages of the worm. When animals were treated with PZQ or  $\beta$ -lap, 45 days after infection, the exudative granulomatous reaction showed less eosinophilic infiltration, granuloma circumscription and eggs degeneration more evidently than in untreated infected controls (Fig. 4C and E).

There was significant reduction ( $p < 0.0001$ ) in the average number of hepatic granulomas in all the groups treated with  $\beta$ -lap or PZQ (Table 1). Fig. 4A and B shows the difference in the numerical density of periovular granuloma distributed in the hepatic tissue of untreated-infected mice and mice treated with  $\beta$ -lap 45 days after infection, respectively.

Only the group treated with the  $\beta$ -lap 45 days after infection showed significant reduction of 25.8% in the average diameter of



**Fig. 3.** Effects of  $\beta$ -lapachone ( $\beta$ -lap) and praziquantel (PZQ), administered from the 45th until the 49th day after infection, on percentage of eggs developmental stages (ogram patterns) in mice infected with *S. mansoni*.



**Fig. 4.** Histological sections of hepatic tissue of mice infected with *S. mansoni* showing periportal hepatic granulomas and mean diameter of granulomas (graphic) per treatment. (A) 40 $\times$  and (D) 100 $\times$ , control group; (B) 40 $\times$  and (E) 100 $\times$ ,  $\beta$ -lap, 45 days after infection; (C) 100 $\times$ , PZQ. (Arrows) inflammatory infiltrate around eggs and (arrow head) granuloma coalescence. In (F)  $\beta$ -lap, 45 days after infection, showed statistical differences in diameter of granuloma in comparison to the control group, \* $p < 0.001$ .

the granuloma when compared to the untreated-infected control groups, which was an average of  $580.8 \pm 64.57 \mu\text{m}$  (Fig. 4D–F). The group treated with PZQ presented a slight reduction in the granuloma diameter, but not a significant one (Fig. 4C and F).

#### Discussion

We have found that  $\beta$ -lap interferes in the life cycles of the *S. mansoni* acting against: skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms. In the therapeutic regimen adopted,  $\beta$ -lap caused significant reductions in loads of worms and hepatic tissue eggs, number and size of granulomas and changed the pattern of oogram. For this evaluation we used the BH strain, which is native from Minas Gerais and predominates in endemic

regions in Brazil (Zuim et al., 2012), a country with about six million people infected and another 25 million at permanent risk of contracting schistosomiasis (Lambertucci, 2010).

When a drug is used to suppress egg-laying, the oogram should demonstrate a higher percentage of mature eggs, as a result of previous ovipositions (Pellegrino et al., 1962). This occurred in our study when mice harboring adult worms were treated with  $\beta$ -lap. In this group there was an exchange of percentages between immature and mature eggs, and a significant increase in dead eggs. In the other experimental groups,  $\beta$ -lap did not change the oogram, since the intervention period occurred during the stages of schistosomula and immature females. In addition, the ovicidal action of PZQ caused inviability of eggs by retraction of miracidia, mostly of mature eggs. The oogram exhibited a greater burden of dead eggs

**Table 1**  
Effects of  $\beta$ -lapachone and praziquantel on worm burdens, eggs and average number of the granulomas in mice harboring different developmental stages of *S. mansoni*, cut barked 60 days after infection.

Administration: days post-infection/development stage	Groups	Average worm burden		Number of eggs/g tissue		Granuloma schistosomitic hepatic				
		Total	Reduction (%)	Female	Reduction (%)	Hepatic $\times 10^3$	Reduction (%)	Average number	Reduction (%)	
$\beta$ -Lapachone (50 mg/kg/day for 5 consecutive days)	1 <sup>st</sup> day/ skin schistosomula	Treated	15.63 $\pm$ 2.56 <sup>*</sup>	29.78	7.37 $\pm$ 1.18 <sup>*</sup>	24.09	8.29 $\pm$ 1.23 <sup>*</sup>	32.71	8.87 $\pm$ 1.88 <sup>*</sup>	49.6
		Control	22.29 $\pm$ 2.29		9.71 $\pm$ 1.11		12.32 $\pm$ 2.42		17.6 $\pm$ 3.05	
	14 <sup>th</sup> day/lung schistosomula	Treated	14.57 $\pm$ 1.62 <sup>*</sup>	37.2	6.85 $\pm$ 0.89 <sup>*</sup>	37.7	7.31 $\pm$ 1.19 <sup>*</sup>	42.07	9.85 $\pm$ 2.11 <sup>*</sup>	51.7
		Control	23.2 $\pm$ 2.38		11.0 $\pm$ 1.0		12.62 $\pm$ 1.67		20.40 $\pm$ 2.40	
	28 <sup>th</sup> day/young worms	Treated	18.17 $\pm$ 2.32 <sup>*</sup>	24.7	8.66 $\pm$ 1.21 <sup>*</sup>	22.26	9.62 $\pm$ 1.27 <sup>*</sup>	34.64	12.0 $\pm$ 1.63 <sup>*</sup>	39.39
		Control	24.14 $\pm$ 2.54		11.14 $\pm$ 1.21		14.72 $\pm$ 1.62		19.8 $\pm$ 1.92	
45 <sup>th</sup> day/adult worms	Treated	13.0 $\pm$ 2.44 <sup>*</sup>	40.22	6.0 $\pm$ 1.15 <sup>*</sup>	39.2	6.81 $\pm$ 0.86 <sup>*</sup>	48.01	8.0 $\pm$ 1.41 <sup>*</sup>	58.76	
	Control	21.75 $\pm$ 3.95		9.87 $\pm$ 1.45		13.1 $\pm$ 2.21		19.4 $\pm$ 2.4		
Praziquantel (50 mg/kg/day for 5 consecutive days)	45 <sup>th</sup> day/adult worms	Treated	1.22 $\pm$ 0.44 <sup>*</sup>	94.66	0.57 $\pm$ 0.53 <sup>*</sup>	93.66	4.69 $\pm$ 0.73 <sup>*</sup>	65.78	6.14 $\pm$ 1.21 <sup>*</sup>	68.99
		Control	2.286 $\pm$ 3.08		90 $\pm$ 1.41		13.68 $\pm$ 2.11		19.80 $\pm$ 2.39	

Values are expressed as mean of 10 mice  $\pm$  SD; groups were tested against their respective control using Student's t-test.

<sup>\*</sup> p < 0.001.

<sup>\*</sup> p < 0.01.

and a lower burden of mature eggs, corroborating with the results of Mantawy et al. (2011).

The  $\beta$ -lap-induced reduction in the burden of eggs and granulomas in hepatic tissue could be attributed to its schistosomicidal activity on female worms at different stages (Table 1). This effect results in a smaller number of granulomatous reactions and liver fibrosis in the course of infection.

Our results indicate that  $\beta$ -lap offers protection against liver injury induced by eggs. The histopathological examination revealed less inflammation of parenchyma and reduction in the size of granulomas when the intervention occurred concomitantly with full maturation of females, when oviposition had already started and eggs had begun to accumulate in liver tissue. At this stage of infection, the granuloma is a delayed hypersensitivity reaction mediated by TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> cells (Pearce and Macdonald, 2002). These cells trigger the Th1 response, with macrophage activation and subsequent synthesis of IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , nitric oxide (NO) and citrulline, determining the extent of inflammation (Modolell et al., 1995; Wynn and Cheever, 1995). In the present study, the reduction in the size of the granuloma can be attributed to the anti-inflammatory activity of  $\beta$ -lap, which inhibits the migration of neutrophils and reduces the synthesis of TNF- $\alpha$ , IL-6, NO and NO-sintetase (Liu et al., 1999; Tzeng et al., 2003; Sitônio et al., 2012). This suggests that  $\beta$ -lap favorably modulate the granulomatous immune response and that therapeutic intervention for a longer period could result in an early resolution of the granuloma. In contrast to PZQ that although decreasing the number of eggs and granulomas in the liver tissue, during the acute phase of infection, did not decrease the size of granulomas, these findings corroborating with the results of Aires et al. (2012).

$\beta$ -Lap is triggering huge interest for its powerful therapeutic properties against various diseases, including cancer, diabetes, obesity, and cardiovascular disease (Dong et al., 2009; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009). Moreover,  $\beta$ -lap has shown, both *in vitro* and *in vivo*, to have antimalarial properties against strains that are both sensitive and resistant to chloroquine (Andrade-Neto et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005), and also to be active against *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011), fungi (Medeiros et al., 2010), both gram positive and gram negative bacteria (Lourenço et al., 2011; Kenneth et al., 2012; Silva et al., 2009) and to inhibit the replication of the HIV-1 virus (Li et al., 1993). It is suggested that these biological activities of  $\beta$ -lap derive from the inhibition of DNA topoisomerase activity or the impairment of DNA repair through reactive oxygen species (ROS) generation via NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 (Krishnan and Bastow, 2000; Reinicke et al., 2005; Bey et al., 2007; Siew et al., 2012). However, information on the schistosomicidal activity mechanism is still not understood. Remarkably, it is well known that ROS generation can induce cytotoxicity and tissue injuries. The increase in ROS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> subsequently depletes the glutathione reserve by oxidizing reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), which could alter the activity of vital enzymes or proteins in *S. mansoni*, resulting in lipid peroxidation and protein disorganization, thereby affecting the parasites' ability to protect themselves from free radicals, resulting in their death (Azza et al., 2005; Kuntz et al., 2007; Seif el-Din et al., 2011). Therefore, the worms' antioxidant defense mechanisms may constitute a good target for chemotherapy (Azza et al., 2005). The most obvious effect of host ROS on the schistosome is on the parasite surface (Mei et al., 1996). The schistosome tegument contains numerous mitochondria, which could be the main target of  $\beta$ -lap.  $\beta$ -Lap affects the mitochondrial functioning by redox cycling-mediated oxidation (Witte et al., 2004), inducing internucleosomal fragmentation of DNA, release of cytochrome c, and activation of caspase-3 (Li et al., 1999a, 1999b; Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008). Recently, Lorsuwannarat et al. (2013) have suggested these

mechanisms work as an action route of 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, known as plumbagin, against *S. mansoni* adult worms. According to Zhai et al. (2002), mature adult worms have a higher anti-oxygen free-radical effect and other biochemical kinds of toxicity than the juvenile worms, leading to a higher mortality rate in juvenile worms than in the mature adult worms of *S. mansoni*. However,  $\beta$ -lap acted similarly in all the development stages evaluated here.

In contrast to PZQ, which causes an increase in the permeability of the membranes of schistosome cells leading to calcium-producing sustained muscular contraction, spastic paralysis and tegument damage (Doenhoff et al., 2008, 2009),  $\beta$ -lap, in tumor cells and in the ileum, promotes the efflux of this ion, suggesting that the increase in plasma  $\text{Ca}^{2+}$  is responsible for its apoptotic effect (Tagliarino et al., 2001; Bentle et al., 2006). This antagonistic effect is, therefore, an important target for future  $\beta$ -lap research regarding the calcium channels of *S. mansoni*.

Naphthoquinones, which include  $\beta$ -lap, have been shown to be active against other phases in the development of *S. mansoni*. Pinto et al. (1997) evaluated naphthoquinone derivatives that might topically inhibit the penetration of *S. mansoni* cercariae. From the derivatives studied, 15 naphthoquinones blocked penetration by cercariae when applied to the tails of mice 24 h prior to infection through the tail. In the group exposed to  $\beta$ -lap, blocking was 100%. In the present study administration of  $\beta$ -lap 24 h after exposure to cercariae reduced the worm burden. Studies conclude that topical formulations that block cercarial penetration may be used as prophylactic drugs in endemic regions (Pinto et al., 1997; Kasny et al., 2007; Haas et al., 2008). Furthermore, naphthoquinones derivatives are also active against the intermediate host of *S. mansoni*. These compounds kill adult snails and the spawn of *B. glabrata* (Lima et al., 2002a,b; Ribeiro et al., 2009).

In view of the limited aqueous solubility of  $\beta$ -lap (Lindenberg et al., 2004), formulations have been developed to ensure greater bioavailability and biological activity, the use of lower doses and a convenient administration route, as well as to control minor side effects (Li et al., 2006; Khong et al., 2007; Yang et al., 2008). In view of the moderate activity of  $\beta$ -lap against *S. mansoni*, the use of new formulations provides the prospect of studies aiming to increase activity and shed light on the action mechanism, and to use this drug as a prototype for the synthesis of new naphthoquinones derivatives with potential schistosomicidal properties.

#### Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

#### Acknowledgement

This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### References

- Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, R.A.R., Schirato, G.V., Filho, N.T.P., Araújo, S.B., Souza, V.M.O., Costa, V.M.A., Malagueño, E., 2012. Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitology Research* 4, 1569–1578.
- Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O.F., Silva-Filho, J.F., Silva, M.J., Pinto, M.C.F.R., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol,  $\beta$ -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 1145–1149.
- Azza, M.M., Nadia, M.M., Sohair, S.M., 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 205–211.
- Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Bey, E.A., Spitz, D.R., Boothman, D.A., 2006. Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *Journal of Biological Chemistry* 281, 33684–33696.
- Bey, E.A., Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Dong, Y., Yang, C.R., Girard, L., Minna, J.D., Bornmann, W.G., Gao, J., Boothman, D.A., 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11832–11837.
- Cheever, A.W., 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization* 39, 328–331.
- Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 659–667.
- Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattocchia, L., Botros, S., Coles, G., Tchuem, T.L.A., Mbaye, A., Engels, D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825–1835.
- Doenhoff, M.J., Kimani, G., Cioli, D., 2000. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Journal Parasitology Today* 16, 364–366.
- Dong, Y., Chin, S.F., Blanco, E., Bey, E.A., Kabbani, W., Xie, X.J., Bornmann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J., 2009. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 15, 131–139.
- Ferreira, S.B., Salomão, K., Silva, F.C., Pinto, A.V., Kaiser, C.R., Pinto, A.C., Ferreira, V.F., Castro, S.I., 2011. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 3071–3077.
- Gonnert, R., Andrews, P., 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 52, 129–150.
- Haas, W., Haeblerlein, S., Behring, S., Schönamsgruber, E., Zopelli, E., 2008. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. *Experimental Parasitology* 120, 94–97.
- Hussain, H., Krohn, K., Ahmad, V.U., Miana, G.A., Green, I.R., 2007. Lapachol: an overview. *ARKIVOC* 2, 145–171.
- Hwang, J.H., Kim, D.W., Jo, E.J., Kim, Y.K., Jo, Y.S., Park, J.H., Yoo, S.K., Park, M.K., Kwak, T.H., Kho, Y.L., et al., 2009. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* 58, 965–974.
- Kasny, M., Mikes, L., Dalton, J.P., Mountford, A.P., Horak, P., 2007. Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599–1609.
- Kenneth, O.E., Senthil, P.K., Victor, K., Gabriel, N.F., Henrietta, L., Marion, J.J.M., Namrita, L., Sundarababu, B., 2012. Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Medicinal Chemistry Research* 21, 2117–2122.
- Khong, H.T., Dreisbach, L., Kindler, H.L., Trent, D.F., Jeziorski, K.G., Boderenko, I., et al., 2007. A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naïve, unresectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 25, 15017.
- Kim, S.Y., Jeoung, N.H., Oh, C.J., Choi, Y.K., Lee, H.J., Kim, H.J., Kim, J.Y., Hwang, J.H., Tadi, S., Yim, Y.H., et al., 2009. Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 prevents arterial restenosis by suppressing vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation Research* 104, 842–850.
- Krishnan, P., Bastow, K.B., 2000. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives – elutherin,  $\alpha$  lapachone and  $\beta$  lapachone. *Biochemical Pharmacology* 60, 1367–1379.
- Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., et al., 2007. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Medicine* 4 (6), e206, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040206>.
- Lambertucci, J.R., 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 422–435.
- Li, C., Nemunaitis, J., Senzer, N., Edelman, G., Glasner, S., Dombal, G., Douvholuk, A., Cunningham, C., 2006. A phase Ib trial of ARQ 501, a selective checkpoint activator, in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 24, 13053.
- Li, C.J., Li, Y.Z., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999a. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 23, 13369–13374.
- Li, Y.Z., Li, C.J., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999b. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine* 5, 232–239.
- Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S., Pardee, A.B., 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1839–1842.
- Lima, N.M.F., Correia, C.S., Ferraz, P.A.L., Pinto, A.V., Pinto, M.C.R.F., Sant'Ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2002a. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13, 822–829.
- Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfirio, Z., Goulart, M.O.F., Santana, A.E.G., 2002b. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia niloticus*. *Acta Tropica* 83, 43–47.
- Lima, O.G., D'Albuquerque, I.C., Lima, C.G., Maia, M.H.D., 1962. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Revista do Instituto de Antibióticos* 4, 3–17.

- Lindenberg, M., Koop, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 265–278.
- Liu, S.H., Tzeng, H.P., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y., 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. *British Journal of Pharmacology* 126, 746–750.
- Lorsuwanarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 133, 18–27.
- Lourenço, A.L., Abreu, P.A., Leal, B., Silva, J.E.N., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Souza, A.M., Novais, J.S., Paiva, M.B., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Ferreira, V.F., Castro, H.C., 2011. Identification of nor- $\beta$ -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. *Current Microbiology* 62, 684–689.
- Mantawy, M.M., Ali, H.F., Rizk, M.Z., 2011. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 53, 155–163.
- Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, A.S., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43, 345–349.
- Mei, H., Thakur, A., Schwartz, J., LoVerde, P.T., 1996. Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* 64, 4299–4306.
- Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Pinto, A.V., Soares, M.J., Castro, S.L., 2007. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazole synthesized from  $\beta$ -lapachone. *Parasitology Research* 101, 895–905.
- Modolelli, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K., 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone-marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal of Immunology* 25, 1101–1104.
- Moon, D.O., Kang, C.H., Kim, M.O., Jeon, Y.J., Lee, J.D., Choi, Y.H., Kim, G.Y., 2010.  $\beta$ -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *Journal Medicinal Food* 13, 481–488.
- Neghina, R., Neghina, A.M., Merkle, C., Marinu, I., Moldovan, R., Iacobiciu, I., 2009. Intestinal schistosomiasis, importation of a neglected tropical disease in Romania: case report of a traveler to endemic regions. *Travel Medicine and Infectious Disease* 7, 49–51.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S. mansoni*. *Journal of Parasitology* 38, 19–23.
- Pearce, E.J., Macdonald, A.S., 2002. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* 7, 499–511.
- Pellegrino, J., Oliveira, C.A., Faria, J., Cunah, A.S., 1962. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosomiasis mansoni* in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 11, 201–215.
- Pérez-Sacau, E., Estévez-braun, A., Ravelo, A.G., Gutiérrez, Y.D., Giménez, T.A., 2005. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. *Chemistry and Biodiversity* 2, 264–274.
- Phillips, S.M., DiConza, J.J., Gold, J.A., Reid, W.A., 1977. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. *Journal of Immunology* 118, 594–599.
- Pinto, A.V., Pinto, M.C.R., Gilbert, B., Pellegrino, J., Mello, R.T., 1997. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 133–135.
- Reinicke, K.E., Bey, E.A., Bentle, M.S., Pink, J.J., Ingalls, S.T., Hoppel, C.L., Misico, R.L., Arzac, G.M., Burton, G., Bornmann, W.G., et al., 2005. Development of beta-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 levels. *Clinical Cancer Research* 11, 3055–3064.
- Ribeiro, K.A.L., Carvalho, C.M., Molina, M.T., Lima, E.P., Lópezmontero, E., Reys, J.R.M., Oliveira, M.B.F., Pinto, A.V., Sant'ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2009. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 111, 44–50.
- Sabah, A., Fletcher, C., Webbe, C., Doenhoff, M.J., 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Experimental Parasitology* 61, 294–303.
- Salas, C., Tapia, R.A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Maya, J.D., Morello, A., 2008. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 668–674.
- Schuerch, A.R., Wehrli, W., 1978.  $\beta$ -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- $\alpha$ . *European Journal of Biochemistry* 84, 197–205.
- Seif el-Din, S.H., Al-Hroob, A.M., Ebeid, F.A., 2011. *Schistosoma mansoni*: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. *Experimental Parasitology* 128, 230–235.
- Siew, E.L., Chan, K.M., Williams, G.T., Ross, D., Inayat-Hussain, S.H., 2012. Protection of hydroquinone-induced apoptosis by downregulation of FAU is mediated by NQO1. *Free Radical Biology and Medicine* 8, 1616–1624.
- Silva, J.L., Mesquita, A.R.C., Ximenes, E.A., 2009. In vitro synergic effect of  $\beta$ -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 580–582.
- Sitônio, M.M., Júnior, C.H.R.C., Campos, I.A., Silva, J.B.N.F., Lima, M.C.A., Góes, A.J.S., Maia, M.B.S., Rolim, P.J.N., Silva, T.G., 2012. Anti-inflammatory and anti-arthritis activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione ( $\beta$ -lapachone). *Inflammation Research* 62, 107–113.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6, 411–425.
- Tagliarino, C., Pink, J.J., Dubyak, G.R., Nieminen, A.L., Boothman, D.A., 2001. Calcium is a key molecule in  $\beta$ -lapachone-mediated cell death. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19150–19159.
- Tzeng, H.P., Ho, F.M., Chao, K.F., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S., Liu, Y.S.H., 2003. Beta-lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168, 85–91.
- Witte, N.V., Stoppani, A.O., Dubin, M., 2004. 2-Phenyl-beta-lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15, 129–135.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia 7, 505–511.
- Yang, R.Y., Kizer, D.K., Wu, H., Volckova, A.E., Miao, X.S., Ali, S.M., 2008. Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 ( $\beta$ -Lapachone) human blood metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 5635–5643.
- Zhai, Z.L., Jiao, P.Y., Mei, J.Y., Xiao, S.H., 2002. Glutathione inhibits the antischistosomal activity of artemether. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases* 20, 212–215.
- Zuim, N.R.B., Allegretti, S.M., Linhares, A.X., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., 2012. A study of the granulomatous responses induced by different strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/953524>.