

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

***Toxocara canis*: avaliação *in vitro*, *in silico* e *ex vivo* de moléculas sintéticas
derivadas da cumarina**

Débora Carvalho Rodrigues

Pelotas, 2021

Débora Carvalho Rodrigues

***Toxocara canis*: avaliação *in vitro*, *in silico* e *ex vivo* de moléculas sintéticas
derivadas da cumarina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área do conhecimento Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos James Scaini

Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Fernandes Ramos

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R696t Rodrigues, Débora Carvalho

Toxocara canis : avaliação *in vitro*, *in silico* e *ex vivo* de moléculas sintéticas derivadas da cumarina / Débora Carvalho Rodrigues ; Carlos James Scaini, orientador ; Daniela Fernandes Ramos, coorientador. — Pelotas, 2021.
54 f.

Dissertação (Mestrado) — Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Toxocaríase. 2. Moléculas sintéticas. 3. Cumarinas. I. Scaini, Carlos James, orient. II. Ramos, Daniela Fernandes, coorient. III. Título.

CDD : 614.555

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Débora Carvalho Rodrigues

Toxocara canis: avaliação *in vitro*, *in silico* e *ex vivo* de moléculas sintéticas derivadas da cumarina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (área de conhecimento: Parasitologia), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos James Scaini (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela

Doutor em Ciências da Saúde - Doenças Parasitárias pelo Centro de Pesquisas

René Rachou – FIOCRUZ

Prof. Dra. Luciana Farias da Costa Avila

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos colaboradores do **Instituto de Tecnologia de Fármacos** (Farmanguinhos) da FioCruz, por produzirem, e do **Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos** NUDEFA/FURG, por disponibilizarem as moléculas utilizadas nesta pesquisa.

À **Universidade Federal de Pelotas**, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia pela oportunidade de realizar o curso de mestrado, a **Universidade Federal do Rio Grande**, onde realizei todas as atividades práticas do estudo e à **CAPES** pela bolsa concedida.

Agradeço especialmente ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos James Scaini**, pois sem seus ensinamentos e compreensão, este trabalho não teria acontecido.

À minha co-orientadora **Prof. Dra. Daniela Fernandes Ramos**, por toda ajuda oferecida e pela paciência nas explicações de bioquímica.

A minha irmã **Márcia** e meu cunhado **Cristiano** por sempre permanecerem ao meu lado e darem todo o suporte que por ventura fosse necessário.

A minha prima **Juliana** pelas conversas que me fizeram trilhar esse caminho acadêmico e por sempre estar ao meu lado dando apoio e trazendo palavras sinceras.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da FURG: Profa. **Luciana Avila, Lourdes Martins, Gabriel Klafke, Caroline Cunha, Gabriela Torres, Débora Walcher, Micaele Moura, Nicholas Frota, Camila Schramm** por toda ajuda, em todos os momentos, que foram muitos, durante estes dois anos de convívio e estudo.

As minhas amigas **Gessyka Velede, Cássia Gallas e Aline Ventura** por serem as melhores amigas que eu poderia ter, por me darem apoio em momentos de dificuldade e por estarem de alguma forma presentes nos momentos de alegria, mesmo quando a distância física se fez presente.

Resumo

RODRIGUES, Débora Carvalho. ***Toxocara canis***: avaliação *in vitro*, *in silico* e *ex vivo* de moléculas sintéticas derivadas da cumarina. Orientador: Carlos James Scaini. 2021. 54 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual negligenciada, cujo o principal agente etiológico é o nematódeo *Toxocara canis*. Os benzimidazólicos, anti-helmínticos de escolha para o tratamento dessa parasitose, apresentam taxas de resolução clínica entre 45 e 70%, devido a sua baixa solubilidade em água e difícil ação em nível tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de moléculas sintéticas derivadas da cumarina (COU) sobre larvas de *Toxocara canis*, além avaliar essas moléculas *in silico* e *ex vivo*. Foram avaliadas onze moléculas (na concentração de 1 mg/mL), em duplicata, em placas de microcultivo, contendo larvas de *T. canis* em meio RPMI-1640, sendo incubadas, a 37°C e tensão de CO₂ de 5%, por 48 horas. Após foi determinada a concentração larvicida mínima (CLM). A molécula COU 6, na CLM de 0,5 mg/mL, e a molécula COU 9, na CLM de 1,0 mg/mL, apresentaram-se eficazes contra 100% das larvas de *T. canis*. Para as análises *in silico* das moléculas COU 6 e COU 9 foram utilizados os softwares Swiss ADME e Molinspiration. As moléculas COU 6 e COU 9 apresentaram parâmetros de biodisponibilidade adequados, como alta capacidade de metabolismo e absorção gastrointestinal, e de permear a barreira hematoencefálica. Outro resultado importante obtido, foi a ausência de citotoxicidade da molécula COU 9 na CLM eficaz (1 mg/mL). Nas condições estudadas, conclui-se que a molécula COU 9 é candidata à composto-protótipo e à testes pré-clínicos, e a molécula COU 6 é potencial candidata.

Palavras-chaves: Toxocaríase; Moléculas Sintéticas, Cumarinas.

Abstract

RODRIGUES, Débora Carvalho. ***Toxocara canis***: evaluation *in vitro*, *in silico* and *ex vivo* of synthetic molecules derived from coumarin. Advisor: Carlos James Scaini. 2021. 54 f. Dissertation (Masters in Biology) – Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Human toxocariasis is a neglected tissue parasitosis, whose main etiological agent is the nematode *Toxocara canis*. Benzimidazole, anthelmintics of choice for this parasitosis treatment, have clinical resolution rates between 45 and 70%, due to its low water solubility and difficult action at the tissue level. The objective of this study was evaluate *in vitro* the activity of synthetic molecules derived from coumarin (COU), on *Toxocara canis* larvae, in addition to evaluating these molecules *in silico* and *ex vivo*. Eleven molecules were evaluated (1 mg/mL), in duplicate, in microculture plates containing *T.canis* larvae in RPMI -1640 medium, being incubated at 37°C, in 5% CO₂ tension, for 48 hours. After, it was determined the minimum larvicidal concentration (CLM). The COU 9 molecule, at 1 mg/mL CLM, and the COU 6 molecule, at 0,5 mg/mL CLM, obtained results against 100% of *T.canis* larvae. The *in silico* analyses of COU 6 and COU 9 molecules were used the softwares: Swiss ADME and Molinspiration. The molecules showed high metabolism capacity and gastrointestinal absorption, besides having the ability to permeate the blood brain barrier. Another important result, was the absence of cytotoxicity of the COU 9 molecule at the effective CLM (1 mg/mL). Under the conditions studied, it is concluded that COU 9 molecule is candidate for prototype compound and pre-clinical testing, and the COU 6 molecule is a potential candidate.

Key-words: Toxocariasis; Synthetic Molecules; Coumarins.

Lista de tabelas

Tabela 1	Tratamento para toxocariase humana, forma visceral, conforme Chen et al. (2018), com modificações.	18
Capítulo 1		
Tabela 1	Estrutura de moléculas sintéticas derivadas de cumarina (n=11)	28
Tabela 2	Percentual de viabilidade e inviabilidade de larvas de <i>Toxocara canis</i> após exposição às moléculas derivadas de cumarina (1 mg / mL)	32
Tabela 3	Percentual de inviabilidade de larvas de <i>Toxocara canis</i> após exposição à diferentes concentrações das moléculas derivadas de cumarina COU 6 e COU 9	32
Tabela 4	Propriedades físico-químicas de moléculas sintéticas de cumarina (COU), segundo a “Regra dos Cinco” de Lipinski (2004)	33
Tabela 5	Parâmetros farmacocinéticos de moléculas sintéticas de cumarina (COU)	33
Tabela 6	Citotoxicidade em cultura de macrófagos murinos da linhagem J774.A1, utilizando diferentes concentrações da molécula COU 9	34

Lista de figuras

Figura 1	Fases do desenvolvimento de um fármaco	14
Figura 2	Estrutura dos benzimidazóis	20
Capítulo 1		
Figura 1	Larvas de <i>Toxocara canis</i> , expostas à molécula sintética derivada de cumarina no teste <i>in vitro</i> . Seta preta: larva inviável - sem motilidade, em posição distendida, com impregnação pelo indicador celular azul de Tripan; Setas amarelas: larvas viáveis - com motilidade e sem impregnação pelo azul de Tripan (objetiva de 10x).	

Lista de abreviaturas e siglas

ABZ	Albendazol
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ATP	Trifosfato de adenosina
BBB	Barreira hematoencefálica – “Blood Brain Barrier”
CLM	Concentração larvicida mínima
COU	Cumarina
DEC	Dietilcarbamazina
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetilssulfóxido
FaMed	Faculdade de Medicina
Farmanguinhos	Instituto de Tecnologia em Fármacos
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GI	Gastrointestinal
IC 50	Índice de citotoxicidade que induz 50% de morte celular
MBZ	Mebendazol
NUDEFA	Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos
NUPEX	Núcleo de Parasitologia Experimental
NZT	Nitazoxanida
TBZ	Tiabendazol

Sumário

	Lista de tabelas	x
	Lista de figuras	xx
	Lista de Abreviaturas e Siglas	xxx
1	Introdução	12
2	Objetivos	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	Revisão Bibliográfica	16
3.1	Toxocaríase humana	16
3.2	Tratamentos da toxocaríase humana	17
3.2.1	Mecanismos de ação dos anti-helmínticos	19
3.2.2	Estudos da eficácia de anti-helmínticos na toxocaríase murina	20
3.3	Potencial terapêutico de moléculas sintéticas	20
3.4	Cumarinas	22
4	Capítulo 1	24
4.1	Introdução	25
4.2	Material e Métodos	26
4.2.1	Obtenção de ovos e larvas de <i>Toxocara canis</i>	26
4.2.2	Moléculas derivadas de cumarina	27
4.2.3	Testes <i>in vitro</i> das moléculas	29
4.2.4	Avaliação dos testes <i>in vitro</i>	29
4.2.5	Concentração larvicida mínima – CLM	29
4.2.6	Análise <i>in silico</i> de parâmetros farmacocinéticos	30
4.2.7	Citotoxicidade	30
4.3	Resultados	31
4.3.1	Testes <i>in vitro</i> e de CLM	31
4.3.2	Biodisponibilidade	32
4.3.3	Citotoxicidade	33
4.4	Discussão	34

4.5	Conclusão	36
4.6	Referências Bibliográficas	37
5	Considerações Finais	43
	Referências Bibliográficas	44

1 Introdução

A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual negligenciada (PARISE et al., 2014; FIALHO & CORREA, 2016), causada principalmente por larvas de *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002). Esse nematódeo parasita uma ampla gama de animais domésticos e selvagens como hospedeiros definitivos e paratênicos, por meio de múltiplas rotas de transmissão, produzindo larvas que permanecem vivas por longos períodos (meses/anos) nos tecidos do hospedeiro e ovos resistentes às condições ambientais. Portanto, o parasito e a doença causada, toxocaríase humana, são modelos adequados para o desenvolvimento de uma abordagem em saúde (HOLLAND, 2017).

Estudos de soroprevalência têm demonstrado que essa parasitose é especialmente prevalente entre crianças de populações socioeconômicas desfavorecidas, tanto nos trópicos e subtropicais quanto em nações industrializadas (MACPHERSON, 2013; FIALHO & CORREA, 2016). Embora se estime que dezenas de milhões de pessoas estejam expostas ou infectadas por *Toxocara* spp., as informações epidemiológicas globais sobre a relação entre soropositividade e toxocaríase são limitadas. Entretanto, estudos recentes sugerem que o efeito da toxocaríase na saúde humana vem sendo reconhecido (GUANGXU, 2018).

A toxocaríase humana é causada pela migração e permanência das larvas de *Toxocara* spp. nos tecidos de órgãos e nos músculos esqueléticos estriados (BEAVER, 1969), podendo causar formas clínicas sistêmicas (visceral, oculta, neurológica, entre outras) e a forma ocular (MAGNAVAL et. al. 2001; DESPOMMIER, 2003; PINELLI & ARANZAMENDI, 2012). Além disso, pode ocorrer reativação das larvas em quiescência com a consequente migração dessas para outros tecidos, como o tecido ocular e encefálico (PAWLOWSKI, 2001).

O tratamento varia de acordo com a sintomatologia e a localização das larvas. Os anti-helmínticos benzimidazólicos, incluindo albendazol (ABZ), tiabendazol

(TBZ) e mebendazol (MBZ), são os mais utilizados para o tratamento (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013), e podem ser associados aos corticosteróides anti-inflamatórios (MACPHERSON, 2013).

O anti-helmíntico ABZ é a primeira escolha para o tratamento da toxocaríase e o MBZ é a segunda opção terapêutica (PAWLOWSKI, 2001; DESPOMMIER, 2003; HOTEZ & WILKINS, 2009), devido à sua menor taxa de absorção nos tecidos extra-intestinais em comparação ao ABZ (MAGNAVAL et al., 2001; CHEN et al., 2018). A resolução clínica observada com o uso de benzimidazólicos é considerada baixa a moderada (45-70%), devido a ineficiente ação em nível tecidual e a baixa tolerabilidade (MAGNAVAL et al., 2001). A baixa solubilidade em água desses compostos parece colaborar com a baixa biodisponibilidade (PAWLOWSKI, 2001). Além disso, a experiência do tratamento em humanos é limitada devido à escassez da realização de ensaios clínicos em pacientes com toxocaríase (OTHAMAN, 2012).

Para o desenvolvimento de um fármaco, existem diversas etapas a serem cumpridas, como a etapa de desenvolvimento da molécula e a etapa pré-clínica, que envolve a realização dos testes *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*, assim como a avaliação em modelos experimentais, além da etapa clínica, com as fases I, II e III (MCMULLIN, 2015) (Figura 1). Sendo importante ressaltar que a toxocaríase visceral murina é o principal modelo para os estudos dessa parasitose (MAGNAVAL et al., 2001). Além disso, as larvas de terceiro estágio de *T. canis* são os alvos tanto nos testes *in vitro* como nos testes pré-clínicos, visto que não há evolução da larva nos camundongos (hospedeiros paratênicos).

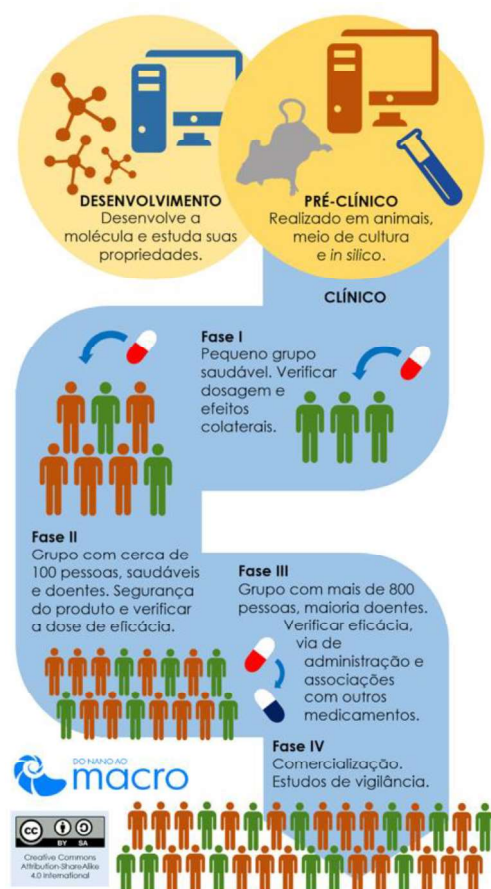


Figura 1. Fases do desenvolvimento de um fármaco (MCMULLIN, 2015).

Nos últimos anos, diversas moléculas híbridas com base de cumarina foram sintetizadas, como derivados conjugados com nitrogênio contendo metades heterocíclicas, como triazol, piridina e pirimidinas, sendo observada ação biológica antiparasitária (SAADEH et. al, 2009). Assim, torna-se importante a realização de estudos que visem selecionar moléculas derivadas de cumarina que possam ser avaliadas em testes pré-clínicos, visando o desenvolvimento de novos anti-helmínticos para o tratamento dessa parasitose tecidual.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Selecionar moléculas sintéticas derivadas de cumarina, por meio de testes *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*, como candidatas a novos fármacos para os testes pré-clínicos do tratamento da toxocaríase visceral.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a ação larvicida de moléculas sintéticas derivadas de cumarina sobre larvas de *Toxocara canis*;
- Determinar *in vitro* a concentração larvicida mínima (CLM) de moléculas sintéticas derivadas de cumarina sobre *Toxocara canis*;
- Analisar *in silico* os parâmetros farmacocinéticos das moléculas sintéticas derivadas de cumarina eficazes nos testes *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade das moléculas derivadas de cumarina na concentração larvicida mínima (CLM) eficaz.
- Selecionar moléculas candidatas a compostos-protótipo para testes pré-clínicos no tratamento da toxocaríase visceral.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Toxocaríase humana

A toxocaríase humana é uma zoonose parasitária cosmopolita, mais prevalente em países de clima tropical e subtropical (CARVALHO & ROCHA, 2011; WOODHALL & FIORI, 2013; MACPHERSON, 2013; GODOY et al., 2020). Trata-se de uma doença negligenciada, cuja prevalência é subestimada devido às dificuldades do diagnóstico clínico e laboratorial (SMITH et al., 2009; MOREIRA et al., 2014).

Os principais agentes etiológicos da toxocaríase humana são os nematódeos do gênero *Toxocara*, os quais pertencem à classe Chromadorea, ordem Ascaridida e a superfamília Ascaridoidea. A espécie *Toxocara canis* Werner, 1782, é a mais frequentemente associada aos casos clínicos dessa parasitose, e em menor escala a espécie *Toxocara cati* Schrank, 1788, parasito intestinal de gatos (CHEN et al., 2018).

Nos cães (hospedeiros definitivos), a transmissão de *T. canis* pode ocorrer pelas vias oral, placentária e mamária. Nos animais jovens, as larvas de terceiro estágio (L3) de *T. canis* realizam a migração pela via linfática e venosa para o fígado e pulmões, onde mudam para L4, as quais sobem a árvore brônquica, atingem a faringe, sendo deglutidas e atingem o intestino, onde amadurecem sexualmente. As fêmeas adultas realizam a postura de ovos que são carregados pelas fezes do hospedeiro, contaminando o ambiente (DESPOMMIER, 2003).

Os ovos se tornam infectantes após um período de duas a quatro semanas no solo, podendo infectar novos hospedeiros definitivos (cães, raposas), hospedeiros paratênicos (bovinos, suínos, roedores, aves, entre outros) ou hospedeiros acidentais (seres humanos) (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981; STRUBE et al., 2013; CHEN et al., 2018). Os ovos de *T. canis* podem permanecer viáveis no ambiente por um ano, quando em temperatura entre 15 e 35°C, umidade acima de 50% e áreas sombreadas (CARVALHO & ROCHA, 2011; GAMBOA, 2005).

O principal modo de infecção em humanos ocorre através da ingestão dos ovos larvados (L3), quando levados à boca através das mãos contaminadas, pela geofagia e pelo consumo de hortaliças mal higienizadas e água (DESPOMMIER, 2003; GODOY et

al., 2020). Outro modo de infecção ocorre no consumo de carnes ou vísceras cruas ou malcozidas de hospedeiros paratênicos, os quais albergam larvas de terceiro estágio (L3) infectantes encistadas nos seus tecidos (HOFFMEISTER et al., 2007).

A toxocaríase humana consiste em uma parasitose tecidual causada pela migração e permanência de larvas de *Toxocara* spp., durante meses ou anos (BEAVER, 1969) em órgãos (fígado, pulmões, rins, olhos, coração, encéfalo) e na musculatura esquelética estriada (DESPOMMIER, 2003; PINELLI & ARANZAMENDI, 2012). As principais formas clínicas são toxocaríase visceral (larva *migrans* visceral) e a toxocaríase ocular (larva *migrans* ocular) (CDC, 2019). Além dessas, podem ocorrer a forma neurológica (toxocaríase neurológica) e a subclínica (toxocaríase oculta) (MAGNAVAL et al., 2001; SMITH et al., 2009; FONSECA et al., 2017).

3.2 Tratamento da toxocaríase humana

O tratamento da toxocaríase humana consiste no emprego de anti-helmínticos, os quais apresentam eficácia baixa a moderada (45-70%) devido a difícil ação dos fármacos em nível tecidual (MAGNAVAL et al., 2001), pela baixa tolerabilidade e necessidade de uso prolongado (PAWLOWSKI, 2001). O uso desses fármacos pode levar a inviabilidade de larvas e liberação de antígenos nos tecidos, determinando aumento dos níveis de anticorpos, associado à eosinofilia sanguínea (CUÉLLAR et al., 1990; MAGNAVAL et al., 1992). Dentre os anti-helmínticos utilizados estão os benzimidazólicos, como MBZ, TBZ e ABZ, os derivados semissintéticos da avermectina B1a, como a ivermectina (OTHMAN, 2012), além da dietilcarbamazina (DEC) (MAGNAVAL et al., 2001). Os principais fármacos indicados no tratamento da forma visceral da toxocaríase humana, podem ser observados na Tabela 1. O ABZ é o anti-helmíntico de primeira escolha e o MBZ é o de segunda escolha para o tratamento dessa parasitose.

O ABZ atinge a concentração sérica máxima em cerca de três horas após administração, exibe atividade sobre as formas adultas, ovos e larvas e é menos tóxico do que os demais fármacos do mesmo grupo (VIEIRA et al., 1996; VIDAL et al., 2003). Entretanto a cura obtida pelo uso do ABZ varia de 45 a 70% (MAGNAVAL et al., 1987;

STÜRCHLER et al., 1989; MAGNAVAL et al., 1987; SMITH et al., 2009; MOREIRA et al., 2014), o que mostra a carência de fármacos mais eficazes para o tratamento dessa parasitose e a importância de pesquisas por compostos bioativos candidatos a novos fármacos.

Tabela 1- Tratamento para toxocariase humana, forma visceral, conforme Chen et al. (2018), com modificações.

Fármacos	Efeitos colaterais	Taxa de eficácia	Fonte
Albendazol (ABZ)* 400mg/2x/d/5d. v. oral	Tontura, náusea, dor abdominal em alguns pacientes	45–70%	Magnaval et al. 1987; Stürchler et al 1989; Magnaval et al. 1995
Mebendazol (MBZ)** 100-200mg2x/d/5d. v. oral	Efeitos semelhantes com ABZ	45–80%	Magnaval et al. 2001; Woodhall & Fiore, 2014; Lescano et al., 2005;
Dietilcarbamazina (DEC)*** 3-4 mg/kg/d/21d v. oral	Hipersensibilidade: prurido, urticária e edema	70%	Magnaval et al. 2001; Stürchler et al 1989

* Primeira escolha; ** Segunda escolha; *** Escolha alternativa

Também se recomenda o tratamento sintomático de suporte, que depende do quadro clínico apresentado pelo paciente, como oxigenoterapia, quando há comprometimento das vias respiratórias, anti-histamínicos, preconizados contra reações alérgicas em geral (TONELLI, 2005). Além de anti-inflamatórios corticosteroides (FINSTERER & AUER, 2007; MACPHERSON, 2013), preconizados principalmente em quadros com sintomatologia neurológica associada (RADMAN et al., 2000) e também como aliados no controle à resposta inflamatória gerada em função da agressão tecidual causada pela migração das larvas (CHEN et al., 2018).

3.2.1 Mecanismos de ação dos anti-helmínticos

De modo geral, os anti-helmínticos exercem efeitos sobre os parasitos pela interferência nos processos de metabolismo energético, coordenação neuromuscular e integridade celular (MARTIN, 1997). A atividade de um anti-helmíntico não só depende da sua ligação ao receptor específico (farmacodinâmica), mas também da capacidade de atingir e manter concentrações elevadas em diferentes tecidos em um período suficiente para induzir o efeito do fármaco (TORRADO et al., 1996). A eficácia das moléculas de um anti-helmíntico está relacionada à capacidade de penetrar na cutícula do nematódeo (ALVAREZ et al., 2007).

Os fármacos benzimidazólicos, em geral, atuam diretamente sobre os microtúbulos dos parasitos adultos, bloqueando a sua capacitação de glicose, o que resulta na depleção de glicogênio e na redução da formação de trifosfato de adenosina (ATP), necessário para a sobrevivência e reprodução dos helmintos (KOROLKOVAS, 2009). Nas larvas, esses fármacos inviabilizam as funções motoras (atividade larvostática), inibindo a motilidade da larva, impedindo que essa realize a migração pelos tecidos (FRIXIONE & MEZA, 2017). Outros estudos demonstram que o TBZ pode inibir o sistema de redução do fumarato da camada muscular das larvas de *T. canis*, provocando também atividade larvostática (ABDEL-HAMEED, 1984; BARDON et al., 1995). Porém esses mecanismos de ação se tornam ineficazes a partir do momento em que há uma tendência de as larvas permanecerem encistadas, em estado de quiescência, nos tecidos do hospedeiro por longos períodos, antes de reassumirem sua atividade migratória, o que dificulta a atividade farmacológica desses fármacos (AIRES et al., 2008).

Há ainda uma estreita ligação entre o comportamento farmacocinético do anti-helmíntico no hospedeiro e sua eficácia final, sendo que o fármaco necessita ultrapassar diferentes "barreiras" para chegar ao seu receptor-alvo no parasito. A absorção do medicamento é o principal fator limitante que determina a quantidade de fármaco que chega à circulação sistêmica (disponibilidade sistêmica). A baixa solubilidade em água dos benzimidazóis parece colaborar para a baixa disponibilidade de compostos desta classe por via oral, como é o caso do ABZ (TORRADO et al.,

1996). Entretanto os benzimidazólicos ainda apresentam resultados superiores em relação à ivermectina (MAGNAVAL et al., 2001), pois se apresentam em sistema de anéis (Figura 2) e estão presentes em outros compostos químicos com diversas atividades farmacoterapêuticas, inclusive na vitamina B12 e nos inibidores da bomba de próton (PODUNAVAC-KUZMANOVIC & CVETKOVIC, 2007).

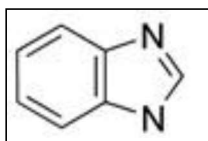


Figura 2 - Estrutura dos benzimidazóis (KOROLKOVAS, 2009).

3.2.2 Estudo de eficácia de anti-helmínticos na toxocaríase murina

Estudos com modelos experimentais foram realizados para avaliar a atividade de diferentes anti-helmínticos sobre a toxocaríase visceral em camundongos infectados por *T. canis*. No estudo com ABZ foi verificado que esse fármaco inviabilizou cerca de 70,5% do total das larvas de *T. canis* (MUSA et al., 2011). Já na avaliação do tratamento com o MBZ foi observada atividade larvostática na fase hepato-pulmonar e atividade larvicida nas fases miotrópica e neurotrópica (BARDON et al., 1995).

Na comparação de três anti-helmínticos não houve diferença significativa na eficácia entre ivermectina, MBZ e TBZ. Observou-se redução da carga parasitária em camundongos, entre 75 e 80% com os três fármacos, porém os autores relatam que uma quantidade não determinada de larvas permanece encistada nos tecidos (LESCANO et al., 2005). Outro estudo comparativo, com a finalidade de avaliar a eficácia da nitazoxanida (NZT) contra larvas de *T. canis*, demonstra que esse fármaco apresenta atividade e taxa de eficácia semelhantes às do MBZ, de xxx e yyyyy, respectivamente (LESCANO et al., 2015).

3.3 Potencial terapêutico de moléculas sintéticas

Por apresentarem uma grande diversidade estrutural e funcional, inúmeros compostos de origem vegetal têm sido utilizados na terapêutica (SANGI, 2016). O emprego de plantas medicinais e de fitoterápicos é incentivado pela Organização Mundial da Saúde, que desde 1978 reconhece as ações profiláticas, paliativas, curativas e diagnósticas desse grupo de medicamentos (BENINI et al., 2010), inclusive como alternativa para o tratamento e controle de parasitoses (NOELLI et al., 1998). Além disso, os produtos de origem vegetal são importantes recursos de atividade biológica e podem servir de base para a síntese de diferentes moléculas (REIS et al., 2010; FALKENBERG et al., 2012). A quantidade e complexidade dos compostos que vem sendo sintetizados aumentou drasticamente, e atualmente constitui uma etapa importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (SANGI, 2016).

Recentemente estudos mostraram que algumas moléculas apresentam potencial larvicida *in vitro* ou em camundongos infectados experimentalmente por *T. canis*. A β -lapachona, C-alil-lausona (0,25 mg/mL) e lapachol (0,5 mg/mL) apresentaram 100% de atividade larvicida *in vitro* sobre *T. canis* (MATA-SANTOS et al., 2015). Também um estudo do nosso grupo com quinona demonstrou que uma naftoxirana (10mg Kg⁻¹/dia/10d, via intraperitoneal) apresenta atividade similar ao ABZ (40 mg/Kg⁻¹, via intragástrica), pela redução na carga parasitária em camundongos BALB/c (MATA-SANTOS et al., 2016a).

É importante ressaltar que os heterocíclicos, grupo presente na estrutura de produtos naturais e sintéticos como as tetraidropiridinas e os pirazóis, apresentam atividade anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antimalárica e anti-helmíntica (larvicida) (AJAY et al., 2000; CUNICO et al., 2006). As amidas graxas também têm sido citadas, como uma nova família de lipídios biologicamente ativa, por apresentarem importância farmacológica e atividades biológicas (PACHER et al., 2006; FLYGARE et al., 2008). O grupo funcional amida é comum em moléculas sintéticas ou de origem natural e está presente em diversos fármacos utilizados (MONTALBETTI et al., 2005). O primeiro estudo sobre amidas graxas contra agente infeccioso mostrou atividade sobre cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. A identificação de amidas graxas biologicamente ativas estimulou pesquisas para isolamento, caracterização e síntese de novas amidas graxas (D'OCA et al., 2010). Em relação à toxocaríase, o

primeiro estudo foi realizado pelo nosso grupo, e a amida graxa linolil pirrolidilamida foi a mais potente, com concentração larvicide mínima (CLM) de 0,05 mg/mL e citotoxicidade de 27% nos macrófagos peritoneais murinos C57BL pelo ensaio MTT (MATA-SANTOS et al., 2016b).

3.4 Cumarinas

A medicina chinesa tem mostrado ao longo dos séculos a extensa atividade biológica relacionada às mais diversas plantas e extratos vegetais (LIU et al., 2006). No Brasil há uma importante biodiversidade de plantas com potencial terapêutico a espera de pesquisas que demonstrem sua bioatividade (NAPOLITANO et al., 2004). Uma família de plantas que vem se destacando no assunto é a Rubiaceae, caracterizada por produzir inúmeras classes de metabólitos com potencial terapêutico, como as cumarinas, alcaloides, terpenos, ácido quinóico glicosídeo e flavonoides (REIS et al., 2016; KALA, 2015). As cumarinas se destacam pelo potencial terapêutico e também são encontradas em abundância em plantas das famílias Apiaceae e Rutaceae (JAIN & JOSHI, 2012).

Diversas moléculas híbridas com base de cumarina foram sintetizadas, como derivados conjugados com nitrogênio contendo estruturas heterocíclicas, como triazol, piridina e pirimidinas, sendo observada ação biológica sobre *Giardia intestinalis* (SAADEH et. al, 2009).

As cumarinas pertencem ao grupo das benzopironas (JOY et al., 2020) e apresentam um anel benzênico fundido a uma lactona em sua estrutura química (LAKE, 1999). A cumarina e seus derivados têm apresentado extensa atividade biológica, como antibiótica, antiviral e anti-inflamatória (MOREIRA et al., 2014), além disso fazem parte da constituição de diversos fármacos já aprovados como anti-coagulantes (acenocumarol, varfarina) que atuam como antagonistas da vitamina K, e antibióticos (novobiocina e cumermicina A1), que se ligam a DNA girase, uma enzima envolvida na divisão celular de bactérias afetando o desenovelamento do DNA e impedindo sua replicação (JOY et al., 2020; CÂMARA, 2011). Além disso, foi demonstrada ação *in vivo* sobre o helminto *Dactylogyrus intermedius* em *Carassius auratus (goldfish)* (LIU et al.,

2016) e ação *in vitro* sobre protozoários *Leishmania major* (NAPOLITANO et al., 2004) e *Trypanosoma cruzi* (COELHO, 2018).

4 Manuscrito: Moléculas derivadas de cumarina: atividade sobre larvas de *Toxocara canis*

Resumo

Os benzimidazólicos, anti-helmínticos de escolha para o tratamento da toxocaríase humana, apresentam taxas de resolução clínica entre 45 e 70%, devido a sua baixa solubilidade em água e difícil ação em nível tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de moléculas sintéticas derivadas da cumarina (COU) sobre larvas de *Toxocara canis*, além avaliar essas moléculas *in silico* e *ex vivo*. Foram avaliadas onze moléculas (1 mg/mL), em duplicata, em placas de microcultivo, contendo larvas de *T. canis* em meio RPMI-1640, sendo incubadas a 37°C, CO₂ de 5%, por 48 horas. Após, foi determinada a concentração larvicida mínima (CLM). A molécula COU 9, na CLM de 1 mg/mL, e a molécula COU 6, na CLM de 0,5 mg/mL, apresentaram-se eficazes contra 100% das larvas de *T. canis*. Nas análises *in silico* das moléculas COU 6 e COU 9 foram utilizados os softwares Swiss ADME e Molinspiration. As moléculas apresentaram biodisponibilidade adequada, pela alta capacidade de metabolismo e absorção gastrointestinal, além da capacidade de permear a barreira hematoencefálica. Outro resultado importante obtido, foi a ausência de citotoxicidade da molécula COU 9 na CLM eficaz (1 mg/mL). Nas condições estudadas, conclui-se que a molécula COU 9 é candidata à compostos-protótipo e à testes pré-clínicos, e a molécula COU 6 é potencial candidata.

Palavras-chaves: Toxocaríase; Moléculas Sintéticas, Cumarinas.

4.1 Introdução

A toxocaríase humana é uma zoonose parasitária cosmopolita (CARVALHO & ROCHA, 2011), cuja prevalência é subestimada, principalmente, devido à carência de um método padrão ouro para o diagnóstico laboratorial e à falta de padronização da abordagem clínica. Outros aspectos que também contribuem para o subdiagnóstico são o polimorfismo clínico e os casos oligoassintomáticos (SMITH et al., 2009; MOREIRA et al., 2014). Essa parasitose tecidual é causada pela migração e permanência de larvas do nematódeo *Toxocara* spp. em órgãos e na musculatura esquelética estriada (BEAVER, 1969), e seu tratamento é baseado na terapia de suporte (GLICKMAN & MAGNAVAL, 1993; MACPHERSON, 2013) e na administração de anti-helmínticos (FINSTERER & AUER, 2007). Os anti-helmínticos benzimidazólicos, incluindo o albendazol (ABZ), tiabendazol (TBZ) e mebendazol (MBZ) são os mais utilizados para o tratamento (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

O anti-helmíntico albendazol (ABZ) é a primeira escolha para o tratamento de pacientes com toxocaríase e o mebendazol (MBZ) é a segunda opção terapêutica (PAWLOWSKI, 2001; DESPOMMIER, 2003; HOTEZ & WILKINS, 2009), devido à sua menor taxa de absorção nos tecidos extra-intestinais em comparação ao ABZ (MAGNAVAL et al., 2001; CHEN et al., 2012). A resolução clínica observada com o uso benzimidazólicos é considerada baixa a moderada (45-70%), devido a ineficiente ação em nível tecidual e a baixa tolerabilidade (MAGNAVAL et al., 2001). Além disso, a baixa solubilidade em água desses compostos parece colaborar com a baixa biodisponibilidade (PAWLOWSKI, 2001).

A eficácia do tratamento com anti-helmíntico é de difícil avaliação, devido à sintomatologia e os marcadores laboratoriais não serem específicos na toxocaríase humana (SMITH et al., 2009; MOREIRA et al., 2014). Além disso, a experiência do tratamento em humanos é limitada devido à escassez da realização de ensaios clínicos em pacientes com toxocaríase (OTHAMAN, 2012).

Dentre os metabólitos secundários de origem vegetal com potencial terapêutico, destacam-se as cumarinas (JAIN & JOSHI, 2012), as quais pertencem ao grupo das benzopironas (JOY et al., 2020) e apresentam em sua estrutura química um anel

benzênico fundido a uma lactona (LAKE, 1999). A cumarina e seus derivados têm apresentado extensa bioatividade, que inclui ações antibióticas, antivirais, anti-inflamatórias e anticoagulantes (MOREIRA et al., 2014), e inclusive fazem parte da constituição de alguns fármacos já aprovados como é o caso dos anticoagulantes, acenocumarol e varfarina; e dos antibióticos, novobiocina e cumermicina A1 (JOY et al., 2020). Além disso, foi demonstrada a sua atividade em estudo *in vivo* sobre o helminto *Dactylogyrus intermedius* em *goldfish* (LIU et al., 2016) e em estudo *in vitro* sobre os protozoários *Leishmania major* (NAPOLITANO et al., 2004) e *Trypanosoma cruzi* (COELHO, 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de moléculas sintéticas derivadas de cumarina sobre larvas de *Toxocara canis*, assim como a sua biodisponibilidade e citotoxicidade, visando selecionar moléculas candidatas a novos fármacos para posterior realização de testes pré-clínicos referentes ao tratamento da toxocaríase visceral.

4.2 Material e Métodos

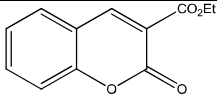
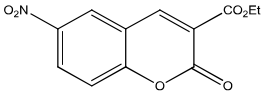
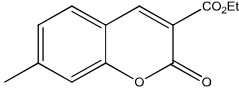
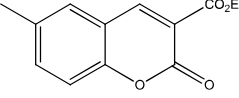
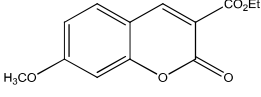
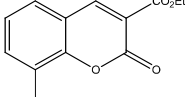
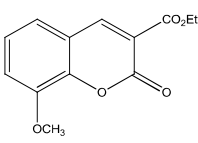
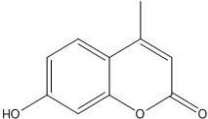
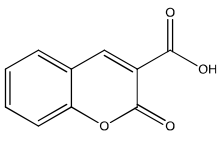
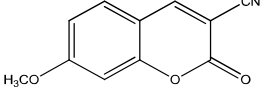
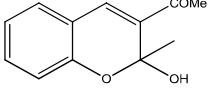
4.2.1 Obtenção de ovos e larvas de *Toxocara canis*

Cães jovens naturalmente infectados por *Toxocara canis* foram tratados com pamoato de pirantel, na dose de 15 mg/kg, por via oral, para a obtenção de formas adultas, que foram identificadas, sexadas e submetidas à histerectomia para coleta de ovos diretamente dos tubos uterinos. Os ovos foram incubados em solução de formalina a 2%, sob temperatura controlada de 28°C, com umidade superior a 90% e submetidos à oxigenação, durante 30 dias (AVILA et al., 2013). A seguir, as larvas foram extraídas em aparelho de Baermann modificado e incubadas em meio RPMI-1640 (Gibco®), suplementado com HEPES 25 mM, glicose 1%, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 µg/mL, fungizona 50 µg/mL e ofloxacina 0,4 µg/mL, em estufa com CO₂ de 5%, a 37°C (MATA-SANTOS et al., 2016a).

4.2.2 Moléculas derivadas de cumarina

Neste estudo foram avaliadas 11 moléculas sintéticas derivadas de cumarina, procedentes do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidas no Banco de compostos do Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos (NUDEFA), da Faculdade de Medicina (FaMed) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Cada molécula foi solubilizada em Dimetilssulfóxido (DMSO) a 2,5% em água destilada estéril, obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL (SATOU et al., 2005). As estruturas das moléculas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura de moléculas sintéticas derivadas da cumarina (n=11).

Código	Estrutura
COU 1	
COU 2	
COU 3	
COU 4	
COU 5	
COU 6	
COU 7	
COU 9	
COU 10	
COU 12	
COU 13	

4.2.3 Testes *in vitro* das moléculas

Os testes *in vitro* das 11 moléculas derivadas da cumarina foram realizados em placa de microcultivo de 96 orifícios de fundo chato (Cral®), contendo 100 larvas de *T. canis* por orifício (volume de 200 µL), em duplicata. Cada molécula foi testada na concentração de 1 mg/mL, diluída em DMSO a 2,5%. Para os controles foram utilizadas larvas vivas de *T. canis* (sem exposição à molécula sintética) e larvas mortas de *T. canis* (previamente submetidas a -20°C / 10 dias, seguido de choque térmico a 60°C), de acordo com a metodologia de Dutra et al. (2013) com modificações. Os testes e os controles foram incubados em meio RPMI-1640, a 37°C, com 5% de CO₂, durante 48 horas. Após, foi adicionado indicador de viabilidade celular azul de Tripán 0,4%, que permaneceu na placa por 30 minutos (MATA-SANTOS et al., 2015).

4.2.4 Avaliação dos testes *in vitro*

A avaliação foi realizada em microscópio óptico (objetivas 10x e 40x), sendo observada a motilidade e impregnação das larvas pelo indicador de viabilidade azul de Tripán (SATOUE et al., 2005; MATA-SANTOS et al., 2015). Assim, foram consideradas larvas viáveis aquelas que apresentavam motilidade e sem impregnação pelo indicador de viabilidade celular azul de Tripán, baseado no estudo desenvolvido por Mata-Santos et al. (2015).

4.2.5 Concentração larvicide mínima - CLM

As moléculas sintéticas que apresentaram atividade sobre 100% das larvas no teste *in vitro*, na concentração de 1 mg/mL, foram selecionadas para determinação da concentração larvicide mínima (CLM). Assim, as moléculas foram testadas em diferentes concentrações (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,05 mg/mL (MATA-SANTOS et al. 2016b), visando confirmar os resultados do teste inicial e determinar a CLM sobre 100% das larvas.

4.2.6 Análise *in silico* de parâmetros farmacocinéticos

A análise *in silico* de parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção) das moléculas selecionadas nos testes *in vitro*, foi realizada utilizando os softwares: Molinspiration (disponível em: molinspiration.com/cgi-bin/properties), Swiss ADME (disponível em: <http://www.swissadme.ch/index.php>) (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017) e OSIRIS Property Explorer. Considerando a “regra dos cinco” de Lipinski (2004), os compostos que não violam as seguintes regras apresentam características que estão associadas à biodisponibilidade oral, indicando solubilidade em meio aquoso e absorção gastrointestinal aceitável: peso molecular ≤ 500 ; $\text{miLogP} \leq 5$; número de doadores de hidrogênio ≤ 5 ; número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 (LIPINSKI, 2004).

4.2.7 Citotoxicidade

Para realizar os ensaios de citotoxicidade foi utilizada uma cultura de macrófagos murinos da linhagem J774.A1 (1.10^5 células/mL) em meio "Meio essencial mínimo de Dulbecco." (DMEM), suplementada com soro fetal bovino a 10%, sendo incubada, em placa de microcultivo de 96 orifícios de fundo chato (Cral®), por 24 horas na temperatura de 37°C e na tensão de CO₂ de 5% (SNEWIN et al., 1999). Após, foram realizados testes de citotoxicidade, em triplicata, com diferentes concentrações das moléculas de cumarina (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,063 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,016 mg/mL), nas mesmas condições de incubação supracitadas. A seguir, foram adicionados 30 μL de resazurina a 0,01% e após 24 horas de incubação, a fluorescência foi mensurada através de leitor de absorbância BioTek™ ELx800™ (ANSAR-AHMED et al., 1994), visando determinar a concentração de moléculas de cumarina capaz de manter a viabilidade de 50% das células (índice de citotoxicidade - IC 50).

4.3 Resultados

Todas as larvas viáveis apresentaram-se com motilidade, integridade morfológica e não impregnadas com azul de Tripan (Figura 1).



Figura 1. Larvas de *Toxocara canis*, expostas à molécula sintética derivada de cumarina no teste *in vitro*. Larva inviável (seta preta): sem motilidade, em posição distendida, com impregnação pelo indicador celular azul de Tripan; Larvas viáveis (seta amarela): com motilidade e sem impregnação pelo azul de Tripan (objetiva de 10x).

4.3.1 Testes *in vitro* e de CLM

Os resultados do teste *in vitro* de moléculas derivadas de cumarina sobre larvas de *T. canis*, podem ser observados na Tabela 2. As moléculas sintéticas COU 6 e COU 9 apresentaram atividade sobre 100% das larvas, na concentração de 1 mg/mL,

portanto, essas foram selecionadas para a avaliação da concentração larvicide mínima (CLM).

Tabela 2. Percentual de viabilidade e inviabilidade de larvas de *Toxocara canis* após exposição às moléculas derivadas de cumarina (1 mg/mL).

Moléculas	CUMARINA – COU (%)											Controle larvas vivas* (%)	Controle larvas mortas** (%)
	1	2	3	4	5	6	7	9	10	12	13		
Viabilidade	84,9	88,4	84,7	85,5	96,7	0	61	0	96,5	98,5	91,9	94,8	0
Inviabilidade	15,1	11,6	15,3	14,5	3,3	100	39	100	3,5	1,5	8,1	5,2	100

* Em 200 µL de meio RPMI 1640.

** Por congelamento à -20°C, durante 10 dias, com posterior choque térmico à 60°C.

As moléculas COU 6 e COU 9 foram novamente submetidas ao teste *in vitro* e confirmaram o resultado obtido na etapa inicial, revelando 100% de eficácia na CLM de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de inviabilidade de larvas de *Toxocara canis* após exposição à diferentes concentrações das moléculas COU 6 e COU 9, derivadas de cumarina.

Moléculas	Concentração mg/mL (%)					Controle de larvas vivas* (%)	Controle de larvas mortas** (%)
	1,0	0,5	0,25	0,125	0,05		
COU 6	100,0	100,0	60,7	16,8	13,4	14,6	100
COU 9	100,0	72,9	10,3	11,3	2,7	14,6	100

* Em 200 µL de meio RPMI 1640.

** Por congelamento à -20°C, durante 10 dias, com posterior choque térmico à 60°C.

4.3.2 Biodisponibilidade

As propriedades físico-químicas e os parâmetros farmacocinéticos das moléculas derivadas da cumarina COU 6 e COU 9 podem ser observados nas Tabela 4 e 5, respectivamente. Esses apresentam características que estão associadas à biodisponibilidade oral, indicando solubilidade em meio aquoso e absorção gastrointestinal aceitável.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas de moléculas sintéticas de cumarina (COU) segundo a “Regra dos Cinco” de Lipinski (2004).

Molécula	Peso Molecular	miLogP	Doadores de Hidrogênio	Aceptores de Hidrogênio
COU 6	232,23 g/mol	2,55	0	4
COU 9	176,17 g/mol	1,89	1	3

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos de moléculas sintéticas de cumarina (COU).

Molécula	Absorção GI*	Permeabilidade BBB**
COU 6	Alta	Sim
COU 9	Alta	Sim

*Absorção gastrointestinal;

**BBB: “Blood Brain Barrier” Permeabilidade na barreira hematoencefálica

4.3.3 Citotoxicidade

Os resultados do ensaio de citotoxicidade da molécula COU 9 podem ser visualizados na Tabela 6. Essa molécula não apresentou citotoxicidade sobre macrófagos murinos da linhagem J774.A1, na concentração de 1 mg/mL, que foi a CLM eficaz sobre larvas de *T. canis*, sendo observado neste estudo inibição celular de 19% na CLM eficaz. Além disso, foi observado IC 50 somente a partir da concentração de 2 mg/mL.

Tabela 6. Citotoxicidade em cultura de macrófagos murinos da linhagem J774.A1, utilizando diferentes concentrações da molécula COU 9.

Parâmetros	Concentração da COU 9 (mg / mL)							
	2,0	1,0	0,5	0,250	0,125	0,063	0,031	0,016
Inibição (%)	47	19	15	7	6	15	18	-3
IC 50	-	-	-	-	-	-	-	-
IC 50	> 2mg							

IC 50: concentração que induz 50% de morte celular.

Foi possível observar que a COU 6 não apresentou citotoxicidade na concentração abaixo de 0,2 mg/mL, no teste qualitativo, realizado previamente com a mesma metodologia citada anteriormente, sendo necessária a avaliação da molécula na concentração de 0,5 mg/mL, que foi a CLM eficaz sobre larvas de *T. canis*.

4.4 Discussão

Neste estudo foi possível observar a atividade de moléculas sintéticas derivadas da cumarina sobre larvas de *T. canis*, sendo esse o primeiro estudo que avaliou tais compostos contra nematódeos. É importante, porém, salientar que nas últimas décadas, diversas moléculas derivadas da cumarina foram sintetizadas e uma extensa bioatividade dessa classe de compostos vem sendo comprovada, inclusive sobre parasitos, como é o caso da atividade de compostos cumarínicos sobre *Dactylogyrus intermedius* em *Carassius auratus (goldfish)*, sendo este um trematódeo importante em regiões da Ásia, Europa Central, Oriente Médio e América do norte, onde causa perdas econômicas significativas na aquicultura (LIU et al., 2016). Além disso, estudos *in vitro* mostraram capacidade inibitória de moléculas cumarínicas sobre promastigotas de *Leishmania major* (NAPOLITANO et al., 2004), formas epimastigotas e tripomastigotas

de *Trypanosoma cruzi* (COELHO, 2018) e inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum* (LACROIX et al., 2011).

Outras pesquisas também revelaram atividade de moléculas sintéticas e semissintéticas derivadas da cumarina sobre os fungos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*, sobre três tipos de células tumorais humanas (Montagner, 2007), sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA, 2005) e sobre larvas de *Aedes aegypti* (GARCEZ et al (2013).

Os resultados obtidos revelaram o potencial de ação de duas moléculas sintéticas derivadas da cumarina nos testes *in vitro*, com 100% de eficácia da molécula COU 6 na CLM de 0,5 mg/mL e da molécula COU 9 na CLM de 1 mg/mL. Quando inseridas nas ferramentas *web* para as análises *in silico*, as moléculas COU 6 e COU 9 apresentaram resultados positivos e dentro dos valores estipulados pela "regra dos cinco" de Lipinski (2004): peso molecular inferior a 500 g/mol, miLogP abaixo de 5, menos que 5 doadores de hidrogênio e menos que 10 aceptores de hidrogênio. Os compostos químicos com peso molecular menor que 500 g/mol, como é preconizado por Lipinski, são transportados com maior facilidade pelas proteínas, o que favorece a absorção e a metabolização (MISHRA et al., 2017). Além disso, moléculas com valores de ligações rotativas (aceptores de hidrogênio) menores que 10, tendem a rotacionar menos, o que facilita seu processo de absorção, já que é necessária uma conformação fixa para que a molécula possa interagir com o seu alvo no organismo (CHEN et al., 2020; CORSINI, 2020).

Os parâmetros de metabolismo e absorção das moléculas COU 6 e COU 9 apresentaram, ainda, características farmacocinéticas positivas, como a alta capacidade de absorção gastrointestinal e a capacidade de permear a barreira hematoencefálica. A absorção gastrointestinal alta é um dos princípios para que o fármaco seja bem distribuído e absorvido pelo organismo sem perdas significativas durante seu metabolismo (LIPINSKI, 2004). Além disso, é importante destacar que a característica positiva de permeabilidade hematoencefálica, revela o potencial terapêutico dessas moléculas, uma vez que a eficácia dos benzimidazóis é voltada

especialmente para as formas adultas de nematódeos encontradas no intestino do hospedeiro (KOROLKOVAS, 2009).

Outro resultado importante obtido, foi a ausência de citotoxicidade da molécula COU 9, na concentração de 1 mg/mL, que foi a CLM eficaz, sendo observado IC 50 apenas em concentrações superiores a 2 mg/mL. No entanto, uma limitação enfrentada pelo estudo foi a impossibilidade de estimar, o IC 50 de COU 6 na concentração de 0,5 mg/mL, que foi a CLM eficaz. Entretanto, em um teste realizado anteriormente dentro do grupo de estudos do NUDEFA-FURG, utilizando as mesmas moléculas nas concentrações de 0,078 a 0,2 mg/mL, foi observado que não houve citotoxicidade em concentrações abaixo 0,2 mg/mL (dados não publicados). Além disso, um estudo realizado por Liu et al. (2016) avaliou a toxicidade de compostos cumarínicos em peixes da espécie *Carassius auratus*, revelando IC 50 em concentração superior a 2,8 mg/mL, o que determina a ausência de citotoxicidade dessas cumarinas em concentrações inferiores a 2,8 mg/mL. Ainda em outro estudo, mais recente, foi avaliada a toxicidade celular e a citotoxicidade aguda de nanosistemas cumarínicos, *in vitro* (com cultivos de macrófagos humanos) e *in vivo* (com camundongos Swiss fêmeas). Esse estudo também revelou que alguns dos nanosistemas cumarínicos utilizados não apresentam citotoxicidade (SILVEIRA, 2020).

Os resultados obtidos abrem caminho para a realização de ensaios pré-clínicos com modelos experimentais, para que as características de biodisponibilidade sejam confirmadas, uma vez que a análise *in silico*, realizada por modelos computacionais (SwissADME e Molinspiration), constituem uma alternativa válida para a avaliação de dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), o que torna o processo de desenvolvimento de fármacos mais ágil (DAINA et al., 2017).

4.5 Conclusão

Nas condições estudadas as moléculas COU 6 e COU 9 apresentam atividade sobre 100% das larvas de *Toxocara canis* na CLM de 0,5 mg/ml e 1 mg/ml, respectivamente. Além disso, essas apresentam parâmetros de biodisponibilidade adequados, como alta capacidade de metabolismo e absorção gastrointestinal, e a

COU 9 não demonstra citotoxicidade na CLM eficaz. Dessa forma, conclui-se que a molécula COU 9 é candidata à composto-protótipo e à testes pré-clínicos, e a molécula COU 6 é potencial candidata.

4.6 Referências Bibliográficas

ANSAR AHMED, S., GOGAL, R. M., AND WALSH, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods** 170, 211–224. DOI: 10.1016/0022-1759(94)90396-4.

AVILA, L. C. ; TELMO, P. L. ; MARTINS, L. H. ; GLAESER, T. ; CONCEICAO, F. R. ; LEITE, F. L. ; SCAINI, C. J. . Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 55, p. 363-365, 2013.

BEAVER, P.C.; The nature of visceral larva migrans. **J Parasitology**. 1969;55:3-12.

CARVALHO E.A.A.; ROCHA R.L. Toxocaríase: larva migrans visceral em crianças e adolescentes. **J. Pediatr.** (Rio J.) vol.87 no.2 Porto Alegre Mar./Apr. 2011.

CHEN, H.; LI M.; LIU, C.; ZHANG, H.; XIAN, M.; LIU H.; Correction to: Enhancement of the catalytic activity of Isopentenyl diphosphate isomerase (IDI) from *Saccharomyces cerevisiae* through random and site-directed mutagenesis. **Microb Cell Fact** 19(1):8, (2020). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1268-9>.

CHEN J, XU MJ, ZHOU DH, SONG HQ, WANG CR, ZHU XQ. Canine and feline parasitic zoonoses in China. **Parasit Vectors**. 2012;5:152.

COELHO, G.S.; **Síntese, modelagem molecular e avaliação da atividade tripanossomicida in vitro de cumarinas tricíclicas bioativas**. 2018. 121 f.

Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

CORSINI, J. D. F. **Bioinformática estrutural aplicada a busca por novos compostos contra os alvos moleculares** p53-Y220C, MDM2, BIRC7, em câncer. 2020.

DAINA, A., MICHIELIN, O. AND ZOETE, V. (2017) 'SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules', **Sci. Rep.**, 7. DOI: 10.1038/srep42717.

DESPOMMIER D (2003) Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev** 16(2):265–272. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>

DUTRA, G. F.; PINTO, N. S. F.; AVILA, L. F. C.; DUTRA, P. C.; TELMO, P. L.; DA HORA, V.P.; MARTINS, L.H.R.; BERNE, M.E.A.; SCAINI, C. J.; Evaluation of the initial and chronic phases of toxocariasis after consumption of liver treated by freezing or cooling. **Parasitol Res** (2013) 112:2171–2175. DOI 10.1007/s00436-013-3376-5 .

FILLAUX J, MAGNAVAL JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Vet Parasitol.** 2013;193:327–36.

FINSTERER, J. & AUER, H.; Review Neurotoxocarosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 49(5):279-287, September-October, 2007.

GARCEZ, W. S.;* GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C.; Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra Aedes aegypti. **Rev. Virtual Quim.**, 2013, 5 (3), 363-393.

GLICKMAN, L. T.; MAGNAVAL, J. F. Zoonotic roundworm infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 7, p. 717-732, 1993.

HOTEZ PJ, WILKINS PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? **PLoS Negl Trop Dis**. 2009;3:e400.

JOY, M.N.; BODKE, Y.D.; TELKAR S.; BAKULEV, V.; Synthesis of Coumarins Linked With 1,2,3-Triazoles under Microwave Irradiation and Evaluation of their Antimicrobial and Antioxidant Activity. **J. Mex. Chem. Soc.** vol.64 no.1 México ene./mar. 2020 Epub 31-Dic-2020.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 15^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2009.

LACROIX, D.; SOIZICO, P.; KAMOGA, D.; KASENENE, J.; BODO, B.; Estrutura e atividade antiparasitária *in vitro* de constituintes da *Citropsis articulata* Root Bark. **J. Nat. Prod.** 2011 , 74 , 10 , 2286-2289. DOI: <https://doi.org/10.1021/np2004825>.

LIPINSKI, C. A. (2004) 'Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution', **Drug Discovery Today: Technologies**, pp. 337–341. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

LIU, GL.; HU, Y.; CHEN, XH.; WANG, GX.; LING, F.; Synthesis and anthelmintic activity of coumarin–imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish. **Bioorganic Med. Chem. Lett.** 26, 5039–5043, 2016.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **Int J Parasitol**, v.43, p.999-1008, 2013.

MAGNAVAL JF, GLICKMAN LT, DORCHIES P, MORASSIN B Highlights of human toxocariasis. **Korean J Parasitol** 39(1):1–11, 2001. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>

MATA-SANTOS T., PINTO N.F., MATA-SANTOS H.A., DE MOURA K.G., CARNEIRO P.F., CARVALHO T.S., DEL RIO K.P., PINTO M.C.F.R., MARTINS L.R., FENALTI J.M., DA SILVA P.E.A. e SCAINI C.J. Anthelmintic activity of lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 57(3):197-204, May-June, 2015.

MATA-SANTOS, T. ; MATA-SANTOS, H. A. ; CARNEIRO, P. F. ; DE MOURA, K. C. G. ; FENALTI, J. M. ; KLAFKE, G. B. ; CRUZ, L. A. X. ; MARTINS, L. H. R. ; PINTO, N. F. ; PINTO, M. C. F. R. ; BERNE, M. E. A. ; DA SILVA, P. E. A. ; SCAINI, C. J. . *Toxocara canis*: anthelmintic activity of quinone derivatives in murine toxocarosis. **Parasitology** , v. 143, p. 1-11, 2016a.

MATA-SANTOS, TAÍS ; D'OCA, CAROLINE DA ROS MONTES ; MATA-SANTOS, HÍLTON ANTÔNIO ; FENALTI, JULIANA ; PINTO, NITZA ; COELHO, TATIANE ; BERNE, M. E. A. ; DA SILVA, PEDRO EDUARDO ALMEIDA ; D'OCA, MARCELO GONÇALVES MONTES ; SCAINI, C. J. . *Toxocara canis*: Larvicidal activity of fatty acid amides. **Bioorganic Med. Chem. Lett.** (Print) , v. 26, p. 739-741, 2016b.

MISHRA, S. S.; KUMAR, N; SIRVI, G.; SHARMA, C.S.; Computational Prediction of Pharmacokinetic, Bioactivity and Toxicity Parameters of Some Selected Anti arrhythmic Agents. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 4, n. 5, p. 143-146, 2017.

MONTAGNER, C.; **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MOREIRA L.M.; MELO M.M.; MARTINS P.A.; LYON J.P.; ROMANI A.P.; CODOGNOTO L.; SANTOS S.C.; OLIVEIRA H.P.M. Photophysical Properties of Coumarin Compounds in Neat and Binary Solvent Mixtures: Evaluation and Correlation

Between Solvatochromism and Solvent Polarity Parameters. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 25, No. 5, 873-881, 2014.

MOREIRA, G.M.S.G.; TELMO, P.L.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, A.N.; MCBRIDE, A.J.A.; SCAINI, C.J.; CONCEIÇÃO, F.R.; Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitol.** xx (2014) 1–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>.

NAPOLITANO, H.B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B.D.G.; ALMEIDA, A.L.C.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G. AND THIEMANN, O.H.; Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** (2004) 37: 1847-1852.

OTHAMAN, A. A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind?. **Acta Trop**, v.124, n.3, p.171–178, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.003>.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **J Helminthol**, v.75, n.4, p.299-305, 2001.

PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. (2012); *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets** 12(1):33–44. <https://doi.org/10.2174/187153012799278956>

SILVEIRA, E.S.; **Desenvolvimento, avaliação da atividade leishmanicida e toxicológica de nanosistema de cumarina (1,2-benzopirona)**. 2020. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M. et al. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasit.**, 25: 182-188, 2009.

SATOU, T., HORIUCHI, A., AKAO, N., KOIKE, K., FUTIJA, K., NIKAIDO, T. (2005). *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst β -carboline alkaloids – in vivo and mouse studies. **Exp. Parasitol.** 110, 134-139.

SNEWIN, V. A., GARES, M. P., GAORA, P. Ó., HASAN, Z., BROWN, I. N., AND YOUNG, D. B. (1999). Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. **Infect. Immun.** 67, 4586–4593, 1999.

SOUZA, S.M.; **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

5 Conclusões Gerais

- As moléculas COU 6 e COU 9 apresentam atividade *in vitro* sobre larvas de *Toxocara canis*;
- A análise *in silico* releva que as moléculas COU 6 e COU 9 apresentam parâmetros de biodisponibilidade e absorção adequados às necessidades de moléculas candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos;
- A molécula COU 9 não demonstra citotoxicidade na concentração larvicida mínima - CLM (1 mg/mL);
- A molécula COU 9 é candidata à composto-protótipo e à testes pré-clínicos para o tratamento da toxocaríase visceral e a molécula COU 6 apresenta-se como potencial candidata.

Referências Bibliográficas

ABDEL-HAMEED, A. A. Efeito do thiabendazol na migração de larvas de *Toxocara canis* no camundongo. **J Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 226-31, 1984.

AIRES, W.O.; FRIAS, R.B.; PASCHOAL, G.R.; NEVES, M.F.; Toxocaríase e larva migrans visceral. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** – ISSN: 1679-7353. Ano vi, número 11, 2008.

AJAY, O. O.; DUHLINSKA, D. D.; AGWALE, S. M.; NJOKU, M. Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 95, p.147-149, 2000.

ALVAREZ, L. I.; MOTTIER, M. L.; LANUSSE, C. E. Drug transfer into target helminth Parasites. **Trends Parasitol.**, v. 23, n. 3, p. 97-104, 2007.

BARDÓN R, CUÉLLAR C, DEL AGUILA C, GUILLEN JL. Evaluation of mebendazole activity on experimental murine toxocariasis by immune complexes determination. **Zentralbl Veterinarmed B.** 1995; 42(4): 235-46.

BEAVER, P.C.; The nature of visceral larva migrans. **J Parasitology**. 1969;55:3-12.

BENINI, E.B.; SARTORI, M.A.B.; BUSCH, G.C.; REMPEL, C.; SCHULTZ, G.; STROHSCHOEN, A.A.G.; Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista Destaques Acadêmicos**, ano 2, n. 3, 2010 - CCBS/UNIVATES.

CÂMARA, B.; Mecanismos de ação dos antimicrobianos. Disponível online em: <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2011/03/mecanismos-de-acao-dos-antimicrobianos.html>. Acesso em: 11 mar 2021.

CARVALHO E.A.A.; ROCHA R.L. Toxocaríase: larva migrans visceral em crianças e adolescentes. **J. Pediatr.** (Rio J.) vol.87 no.2 Porto Alegre Mar./Apr. 2011.

CDC. **Toxocaríase**: Epidemiologia e Fatores de Risco. Disponível online em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/epi.html>. Acesso em: 29 dez 2020.

CHEN, J.; LIU, Q.; LIU, G-H.; ZHENG, W-B.; HONG, S-J.; SUGIYAMA, H.; ZHU, X-Q.; ELSHEIKHA, H. M.; Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. **Infect Dis Poverty** 7, 59 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>.

COOPER, G.M.; (2000). **A célula: uma abordagem molecular**. 2ª edição. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

CUÉLLAR C, FENOY S, GUILLÉN JL. Dinámica de la respuesta humoral en dos cepas murinas. I. Inoculación con huevos embrionados de *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* y *Ascaris suum*. **Rev Iber Parasitol.** 1990; 50(1-2): 137-50.

CUNICO, W.; CECHINEL, C. A.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; DE SOUZA, M. V. N.; FREITAS, I. O.; SOARES, R. P. P.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)- chloroquine analogues. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 649–653, 2006.

DELGADO, O.; BOTTO, C.; MATTEI, R.; Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. **Ann Trop Med Parasitol**, v.83, n.6, p. 621-4, 1989

DESPOMMIER D (2003) Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev** 16(2):265–272. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>

D´OCA, C.R.M.; COELHO, T.; MARINHO, T.G.; HACK, C.R.L.; DUARTE, R.C.; DA SILVA, P.A.; D´OCA, M.G.M. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2010, 20, 52.

FALKENBERG, M.B. QUINONAS. IN: SIMÕES C.M.O, SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R., EDITORS. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS; 2004. p. 1102.

FIALHO, P.M.M; CORRÊA, C.R.S. A Systematic Review of Toxocariasis: A Neglected But High-Prevalence Disease in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 6, p. 1193-1199, 2016.

FILLAUX J, MAGNAVAL JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Vet Parasitol.** 2013;193:327–36.

FINSTERER, J. & AUER, H.; Review Neurotoxocarosis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 49(5):279-287, September-October, 2007.

FLYGARE, J.; SANDER, B.; **Semin. Cancer Biol.** 2008, 176.

FONSECA, G. R.; SANTOS, S. V.; CHIEFFI, P. P.; PAULA, F. M.; GRYSCHKE, R. C. B.; LESCANO, S. A. Z.; Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 112(5): 382-386, 2017.

FRIXIONE, E.; MEZA, I.; **Máquinas vivas: como as células se movem?** . Fundo de Cultura Econômica, 2017.

GAMBOA, M.I. Efeitos da temperatura e umidade no desenvolvimento de ovos de *Toxocara canis* em condições laboratoriais. **J Helminthol.** 2005. Dez;79(4):327-31. DOI: 10.1079/joh2005287. 16336716.

GLICKMAN, L.T., SCHANTZ, P.M., 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiol. Rev.** 3, 230–250.

GODOY, P.B.; MAUVEZIN, J.; BASMADJIAN, Y.; SAYAGUÉS, B.; GIACHETTO, G.;
Toxocariasis: manifestaciones clínicas y de laboratorio en niños asistidos en un
prestador integral de salud privado de Montevideo, Uruguay (2014-2018). **Rev Méd**
Urug 2020; 36(1):6-11 DOI: 10.29193/RMU.36.1.1

GUANGXU, M.; HOLLAND, C.V.; WANG, T.; HOFMANN, A.; FAN, C.K.; MAIZELS,
R.K.; HOTEZ, P.J.; GASSER, R.B.; (2018) Human toxocariasis. **Lancet Infect Dis**
18:14–24.

HOFFMEISTER, B., GLAESER, S., FLICK, H., PORNSCHLEGEL, S., SUTTORP, N.,
BERGMANN, F. (2007). Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. **Am.**
J. Trop. Med. Hyg. 76, 600-602.

HOLLAND, CV. **Parasitology** , Volume 144 , Special Issue 1: One Health: parasites and
beyond. Janeiro de 2017 , pp. 81 - 94DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182015001407>

JAIN, P. K., E JOSHI, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile. **J.**
Appl. Pharm. Sci., 2(6), 236–240.

JOY, M.N.; BODKE, Y.D.; TELKAR, S.; BAKULEV, V.; Synthesis of Coumarins Linked
With 1,2,3-Triazoles under Microwave Irradiation and Evaluation of their Antimicrobial
and Antioxidant Activity. **J. Mex. Chem. Soc.** vol.64 no.1 México ene./mar. 2020
Epub 31-Dic-2020.

KALA SC. Medicinal Attributes of family *Rubiaceae*. **Int J Pharm Biol Sci.** 2015;
5(2):179-81.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 15ª ed. Guanabara Koogan,
Rio de Janeiro, 2009.

LACROIX, D.; SOIZICO, P.; KAMOGA, D.; KASENENE, J.; BODO, B.; Estrutura e atividade antiparasitária in vitro de constituintes da *Citropsis articulata* Root Bark. **J. Nat. Prod.** 2011 , 74 , 10 , 2286-2289. DOI: <https://doi.org/10.1021/np2004825>.

LAKE, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology** : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 37(4), 423– 453.

LESCANO, S.A.Z.; SANTOS, S.V.; ASSIS, J.M.L.; CHIEFFI, P.P.; (2015). Eficácia de nitazoxanide contra *Toxocara canis*: recuperação larval e resposta imune humorística em camundongos infectados experimentalmente. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 57(4), 337-341.

LESCANO, S.A.Z.; CHIEFFI, P.P.; AMATO N.V.; IKAI, D.K.; RIBEIRO, M.C.S.A.; (2005). Anti-helmínticos na toxocaríase experimental: efeito na recuperação de larvas de *Toxocara canis* e na resposta humoral. **J Bras Patol Med Lab**, 41(1), 21-24.

LIU, GL.; HU, Y.; CHEN, XH.; WANG, GX.; LING, F.; Synthesis and anthelmintic activity of coumarin–imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** . 26, 5039–5043, 2016.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **Int J Parasitol**, v.43, p.999-1008, 2013.

MAGNAVAL JF, GLICKMAN LT, DORCHIES P, MORASSIN B Highlights of human toxocariasis. **Korean J Parasitol** 39(1):1–11, 2001. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>

MAGNAVAL JF. Comparative efficacy of diethylcarbamazine and mebendazole for the treatment of human toxocariasis. **Parasitology**. 1995;110:529–33.

MAGNAVAL, J. F.; FABRE, R.; MAURÉRES, P. LARRARD, B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and post-treatment follow-up of human toxocariasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2269-2274, 1992.

MAGNAVAL JF, CHARLET JP. Comparative efficacy of thiabendazole and mebendazole in the treatment of toxocariasis. **Thérapie**. 1987;42:541–4.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **Vet. J.**, v. 154, p. 11-34, 1997.

MATA-SANTOS T., PINTO N.F., MATA-SANTOS H.A., DE MOURA K.G., CARNEIRO P.F., CARVALHO T.S., DEL RIO K.P., PINTO M.C.F.R., MARTINS L.R., FENALTI J.M., DA SILVA P.E.A. e SCAINI C.J. Anthelmintic activity of lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 57(3):197-204, May-June, 2015.

MATA-SANTOS, T. ; MATA-SANTOS, H. A. ; CARNEIRO, P. F. ; DE MOURA, K. C. G. ; FENALTI, J. M. ; KLAFKE, G. B. ; CRUZ, L. A. X. ; MARTINS, L. H. R. ; PINTO, N. F. ; PINTO, M. C. F. R. ; BERNE, M. E. A. ; DA SILVA, P. E. A. ; SCAINI, C. J. . *Toxocara canis*: anthelmintic activity of quinone derivatives in murine toxocarosis. **Parasitology** , v. 143, p. 1-11, 2016a.

MATA-SANTOS, TAÍS ; D'OCA, CAROLINE DA ROS MONTES ; MATA-SANTOS, HÍLTON ANTÔNIO ; FENALTI, JULIANA ; PINTO, NITZA ; COELHO, TATIANE ; BERNE, M. E. A. ; DA SILVA, PEDRO EDUARDO ALMEIDA ; D'OCA, MARCELO GONÇALVES MONTES ; SCAINI, C. J. . *Toxocara canis*: Larvicidal activity of fatty acid amides. **Bioorganic Med. Chem. Lett.** (Print) , v. 26, p. 739-741, 2016b.

MCMULLIN, G.; (2015) **Importância do estudo clínico**: o caso da fosfoetanolamina. Disponível online em: <http://www.nano-macro.com/2015/10/importancia-do-estudo-clinico-o-caso-da.html>. Acessado em: 15 de fev. 2021.

MONTALBETTI, C.A.G.N.; FALQUE, V.; Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**. 2005, 61, 10827.

MOREIRA L.M.; MELO M.M.; MARTINS P.A.; LYON J.P.; ROMANI A.P.; CODOGNOTO L.; SANTOS S.C.; OLIVEIRA H.P.M. Photophysical Properties of Coumarin Compounds in Neat and Binary Solvent Mixtures: Evaluation and Correlation Between Solvatochromism and Solvent Polarity Parameters. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 25, No. 5, 873-881, 2014.

MOREIRA, G.M.S.G.; TELMO, P.L.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, A.N.; MCBRIDE, A.J.A.; SCAINI, C.J.; CONCEIÇÃO, F.R.; Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends Parasitol.** xx (2014) 1–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>.

MUSA D.; SENOCAC G.; BORAZAN, G.; ALTAS, M.; OZGONUL, A.; SOGUT, O.; GÜLDÜR, M.E.; Effects of Nigella Sativa and Albendazole alone and in combination in Toxocara Canis infected mice. **J Pak Med Assoc** Vol. 61, No. 9, September 2011.

NAPOLITANO, H.B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B.D.G.; ALMEIDA, A.L.C.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G. AND THIEMANN, O.H.; Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** (2004) 37: 1847-1852.

NOELLI FS. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **Diálogos**. 1998; 2(1) 177-199.

OLIVEIRA- SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C.
Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v.103, n.1-2, p.19-27, 2002.

OTHAMAN, A. A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind?.
Acta Trop, v.124, n.3, p.171–178, 2012, DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.003>.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacol Rev.** , v. 58, p. 389-462, 2006.

PARISE, M.E; HOTEZ, P.J; SLUTSKER, L. Neglected parasitic infections in the United States: needs and opportunities. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n.5, p. 783–785 2014.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **J Helminthol**, v.75, n.4, p.299-305, 2001.

PINELLI E, ARANZAMENDI C (2012); *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets** 12(1):33–44.
<https://doi.org/10.2174/187153012799278956>

PODUNAVAC-KUZMANOVIC, S. O.; CVETKOVIC, D. M. Antibacterial evaluation of some benzimidazole derivatives and their zinc (II) complexes. **J. Serbian Chem. Soc.**, v. 72, n. 5, p. 459-466, 2007.

RADMAN, N.; GUARDIS, M.; SCHAMUN, A.; TESTI, A.; ARCHELLI, S.; FONROUGE, R.; SANTILLÁN, G.; (2000). Toxocariase neurológica: descrição de um caso clínico. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**, 38(3), 196-2000.

REIS M., TRINCA A., FERREIRA M.J., MONSALVE-PUELLO A.R., GRÁCIO M.A.A.
Toxocara canis: potential activity of natural products against second-stage larvae *in vitro*
 and *in vivo*. **Exp Parasitol.** 2010;126:191-7.

SAADEH, H. A.; MOSLEH, I. M.; EL-ABADELAH, M. M. Nova Síntese e Atividade
 Antiparasitária do Modelo 5-Aryl-1-metil-4-nitroimidazoles. **Moléculas** 2009, 14(8),
 2758-2767; <https://doi.org/10.3390/molecules14082758>.

SANGI, D.P.; Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese
 orientada pela diversidade estrutural. **Quim. Nova**, Vol. 39, No. 8, 995-1006, 2016.

STRUBE C, HEUER L, JANECEK E *Toxocara spp.* infecções em hospedeiros
 paratênicos. **Vet Parasitol.** 15 de abril de 2013; 193 (4): 375-89.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M. et al. How common is human toxocariasis?
 Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasit.**, 25: 182-188, 2009.

STÜRCHLER D, SCHUBARTH P, GUALZATA M, GOTTSTEIN B, OETTLI A.
 Thiabendazole vs albendazole in treatment of toxocariasis: a clinical trial. **Ann Trop
 Med Parasitol.** 1989;83:473–8.

TONELLI, E.; Toxocaríase e asma: associação relevante. **J. Pediatr.** - Vol. 81, Nº2,
 2005.

TORRADO S, TORRADO S, CADORNIGA R, TORRADO JJ. Formulation parameters of
 albendazole solution. **Int J Pharm.** 1996;140:45-50.

VIDAL, J.E.; SZTAJNBOK, J. & SEGURO A.C. - Eosinophilic meningoencephalitis due
 to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**,
 69: 341-343, 2003.

VIEIRA, M.A.; ALVARENGA, F.R.; SANTOS, E.C.P.M.; OLIVEIRA, J.A.; Avaliação da eficácia do albendazol sobre a larva migrans visceral murina experimental por *Toxocara canis*. **Rev. Pat. Trop.**25 (1): 23-29, jan/jun. 1996.

WOODHALL, D.M. AND FIORE, A.E.; Toxocariasis: A Review for Pediatricians.
J Pediatric Infect Dis Soc., Vol. 3, No. 2, pp. 154–9, 2014. DOI:10.1093/jpids/pit066.