



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM  
MESTRADO**

**MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DO NEROLIDOL EM  
ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
SCHISTOSOMA MANSONI**

**Guarulhos**

**2017**

**MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DO NEROLIDOL EM  
ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM  
SCHISTOSOMA MANSONI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Guarulhos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué de Moraes

**Guarulhos**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

S586

Silva, Marcos Paulo Nascimento da  
Atividade antiparasitária do Nerolidol em animais experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni* / Marcos Paulo Nascimento da Silva. -- 2017.

40 f.; 31 cm.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Josué de Moraes

Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2017.

1. Antiparasitário 2. *Schistosoma mansoni* 3. Nerolidol I. Título II. Moraes, Josué, (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 610.73

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, intitulada “**Atividade antiparasitária do nerolidol em animais experimentalmente infectados com Schistosoma mansoni**”, em sessão realizada em 07 de dezembro de 2017, considerou o candidato **Marcos Paulo Nascimento da Silva** aprovado.

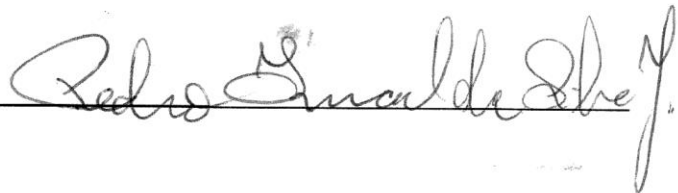
1. Prof. Dr. Josué de Moraes \_\_\_\_\_



2. Prof. Dr. Bruno Bueno Silva \_\_\_\_\_



3. Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior \_\_\_\_\_



*É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua produção total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que citada a fonte.*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos, familiares, amigos e  
todas as pessoas presentes em minha vida.  
Minha eterna gratidão

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Josué de Moraes, pelo constante apoio, orientação e amizade ao longo de minha formação acadêmica. Sua inestimável contribuição para minha formação permitiu-me olhar a ciência não apenas na esfera acadêmica, mas o papel social que ela exerce, para a melhoria da qualidade de vida das pessoas. Agradeço pela oportunidade e confiança depositada para exercer as atividades realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN) e instituições parceiras.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade de Guarulhos, Dra. Ana Claudia Giesbrecht Puggina, Dra. Rosa Áurea Quintella Fernandes, Dra. Ana Llonch Sabatés, Dra. Maíra Rosa Apostólico. Dra. Fernanda Amendola, Dr. André Oliveira Paggiaro e Dra. Viviane Fernandes de Carvalho, pelas estratégias de ensino adotadas e conhecimentos compartilhados que muito contribuíram nesta etapa de minha formação.

Ao Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, Diretor do Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz pela valiosa colaboração, disponibilizando toda a estrutura do laboratório, fornecimento dos vermes de *Schistosoma mansoni* e inoculação dos camundongos nos ensaios in vivo. A equipe de técnicos, Jefferson, Silvia e Anderson pelo suporte na execução da técnica de perfusão.

Aos demais colaboradores, que em suas especialidades foram fundamentais para a realização do presente estudo, Dra. Silmara M. Alegretti (Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas), Dra. Maria C. Salvadori e Dra. Fernanda S. Teixeira, (Instituto de Física, Universidade de São Paulo), Dr. Damião P. de Sousa (Departamento de Ciências Universidade, Federal da Paraíba).

Aos alunos de Iniciação Científica dos primórdios do NPDN: Carla, Fafá, Daniela, Tatiane e o grande amigo Cristiano Rastaman. Aos recentes integrantes, Talita, Audrey, Ana, Thiago, Natalia, Ramon e Daniel. Alunos, como é bom ouvir - Marcos....estou com uma dúvida. Marcos! O Prof. Josué pediu pra você revisar o meu trabalho. Aprendi muito auxiliando vocês.

Ao meu mestre Dr. Daisaku Ikeda. Aos companheiros de prática Budista, Lidiane, Maria das Graças, Rita, Regina, Maria da Paz, Edson Sato, Sr. Fuziki e Sra Chie, Família Nakamura e todos os amigos da Comunidade Bonsucesso.

Aos amigos que fiz no programa de mestrado Juliana, Priscila, Eliane, Rosana, Rodrigo, Francisco, Jair, Jose Dutra e Murillo. O intervalo durante as disciplinas foram os melhores.

A todos os amigos da família E.E Dona Chiyo Yamamoto. Em especial aos meus mestres Professores Rivaldo, Eliane, Waldemar, Rogério Amorin e Jurandir. Minha eterna gratidão, por todos os ensinamentos, incentivos e apoio durante os anos de convivência enquanto aluno e docente.

A minha família: meus pais Estênio e Vera, aos meus queridos irmãos Marcio, Paula e Agnes. Minha cunhada Lú e meu cunhado Daniel e minhas sobrinhas Isis e Daniela, os diamantes da família. Ao meu querido Tio Carlos pelo carinho e apoio de sempre.

A minha amada esposa Andréa, pela compreensão, paciência, incentivo, mimos e pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões. Ganhei também uma nova família. Cláudia, Luzia, Reinaldo e sua família, Dedel, Xandão. Simone e os garotos mais pentelhos do universo Matheus, Juninho e Vinicius.

Silva, MPN. **Atividade Antiparasitária do Nerolidol em Animais Experimentalmente Infectados com *Schistosoma mansoni***. Guarulhos (SP): Universidade Guarulhos; 2017.

## RESUMO

**Introdução:** A esquistossomose, causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, é uma doença parasitária que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo mundo. Considerada uma Doença Negligenciada, o tratamento da esquistossomose é baseado no uso de apenas um fármaco, praziquantel, cujo uso tem sido objeto de preocupação no tocante ao aparecimento de parasitos tolerantes/resistentes. Diante desse cenário, faz-se necessária nova alternativa terapêutica visando o tratamento da esquistossomose e outras helmintíases. Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um terpeno encontrado em muitas espécies de plantas e seu uso como aditivo alimentar é aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* e *European Commission*. Estudos recentes do nosso grupo mostraram o efeito antiparasitário do nerolidol em adultos de *Schistosoma mansoni ex vivo*. **Objetivo:** Avaliar o efeito do nerolidol em camundongos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. **Método:** Grupos de animais foram tratados oralmente com dose única de nerolidol (100, 200 e 400 mg/kg) 49 dias após infecção (vermes adultos) e com nerolidol 400 mg/kg 21 dias após infecção (vermes juvenis). **Resultados:** Em animais infectados com parasitos adultos, comparativamente a grupos de animais infectados e não tratados, nerolidol 400 mg/kg reduziu a carga parasitária em 70.06% ( $P < 0.001$ ); o oograma quantitativo e qualitativo mostrou uma redução de 84.6% ( $P < 0.001$ ) dos ovos imaturos. Além disso, pelo método Kato-Katz notou-se uma redução de 75.2% ( $P < 0.001$ ) no número de ovos/grama nas fezes de animais tratados com 400 mg/kg de nerolidol. Ademais, a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou alteração no tegumento dos helmintos após tratamento com nerolidol 400 mg/kg. Por outro lado, nerolidol 400 mg/kg teve baixa eficácia em camundongos albergando vermes juvenis. **Conclusão:** Em conjunto, considerando a segurança e o baixo custo do nerolidol, os resultados deste estudo indicam que o nerolidol é um composto promissor para o tratamento e controle da esquistossomose.

**Palavras-chave:** Antiparasitário; *Schistosoma mansoni*; Nerolidol.



Silva, MPN. **Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis.** Guarulhos (SP): University of Guarulhos; 2017.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Schistosomiasis is a major public health problem worldwide, especially in poor communities. Since praziquantel is currently the only drug available to treat schistosomiasis, there is an urgent need to identify new antischistosomal drugs. Nerolidol is a sesquiterpene present as an essential oil in several plants that has been approved by the FDA. **Objectives:** This study evaluated the in vivo antischistosomal activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis infected with either adult or juvenile stages of *Schistosoma mansoni*. **Method:** Groups of 10 mice were treated orally with single doses of nerolidol (100, 200 or 400 mg/kg) at 49 days post-infection (p.i.). Then, on the basis of their in vivo activity against adult schistosomes (patent infection), nerolidol was tested in mice harbouring juvenile *S. mansoni* (pre-patent infection). **Results:** A single dose of nerolidol (100, 200 or 400 mg/kg) administered orally to mice infected with adult schistosomes resulted in a reduction in worm burden and egg production. Treatment with the highest nerolidol dose (400 mg/kg) caused significant reduction in a total worm burden of 70.06% ( $P < 0.001$ ). Additionally, the technique of quantitative and qualitative oograms showed that a single 400 mg/kg nerolidol dose achieved an immature egg reduction of 84.6% ( $P < 0.001$ ). In faecal samples, the Kato–Katz method also revealed a reduction of 75.2% in eggs/g at a dose of 400 mg/kg ( $P < 0.001$ ). Furthermore, scanning electron microscopy revealed that nerolidol-mediated worm killing was associated with tegumental damage. In contrast to activity against adult *S. mansoni* infection, oral treatment with nerolidol 400 mg/kg had low efficacy in mice harbouring juvenile schistosomes. **Conclusion:** Since nerolidol is already in use globally as a food additive and has a proven safety record, evaluation of this natural compound's potential for treatment of schistosomiasis could be entirely cost effective in the near future.

**Descriptors:** Antiparasitic; *Schistosoma mansoni*; Nerolidol.

Silva MPN. **Actividad Antiparasitaria del Nerolidol en Animales Experimentalmente Infeccionados con *Schistosoma mansoni*** [disertación]. Guarulhos (SP): Universidad Guarulhos; 2017.

## RESUMEN

**Introducción:** La esquistosomiasis, causada por helmintos del género *Schistosoma*, es una de las principales enfermedades parasitarias en términos de morbilidad y mortalidad, afectando a más de 200 millones de personas en todo el mundo. Considerada una enfermedad olvidada, el tratamiento de la esquistosomiasis se basa en el uso de un fármaco, praziquantel. Ante este escenario, se hace necesaria una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de la esquistosomiasis y otras helmintias. Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) es un terpeno encontrado en muchas especies de plantas y su uso ha sido aprobado por la U. Food and Drug Administration (FDA) y la Comisión Europea. **Objetivo:** En el presente estudio se evaluó el efecto del nerolidol en camungondos experimentalmente infectados con *S. mansoni*. **Método:** Grupos de animales fueron tratados oralmente con una dosis única de nerolidol (100, 200 y 400 mg/kg) 49 días después de la infección (parásitos adultos) y con nerolidol 400 mg/kg 21 días (parásitos juveniles). **Resultados:** En animales albergando parásitos adultos, en comparación con grupos de animales infectados y no tratados, nerolidol 400 mg / kg redujo la carga parasitaria en 70.06% ( $P < 0.001$ ); el marco cuantitativo y cualitativo mostró una reducción del 84.6% ( $P < 0.001$ ) de los huevos inmaduros. Además, por el método Kato-Katz se observó una reducción del 75.2% ( $P < 0.001$ ) en el número de huevos / gramos en las heces de animales tratados con 400 mg / kg de nerolidol. Además, el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) mostró alteración en el tegumento de los helmintos después del tratamiento con nerolidol 400 mg/kg. Por otro lado, nerolidol 400 mg/kg tuvo baja eficacia en ratones albergando gusanos juveniles. **Conclusión:** En conjunto, considerando la seguridad y el bajo costo del nerolidol, los resultados de este estudio indican que el nerolidol es un compuesto prometedor para el tratamiento y control de la esquistosomiasis.

**Descriptores:** Antiparasitario; *Schistosoma mansoni*; Nerolidol.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do terpeno nerolidol.....	20
<b>Figura 3.</b> Manutenção do Ciclo de Vida de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	21

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
<b>3 MÉTODO.....</b>	<b>19</b>
3.1 Tipo de Estudo.....	19
3.2 Local do Estudo.....	19
3.3 Composto.....	19
3.4 Parasito e animais hospedeiro.....	20
3.5 Manutenção do ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
3.6 Infecção de camundongos e design experimental.....	21
3.6.1 Tratamento dos animais 49 dias após infecção (verme adulto).....	21
3.6.2 Tratamento dos animais 21 dias após infecção (verme juvenil).....	22
3.7 Análise da ação esquistossomicida <i>in vivo</i> .....	22
3.7.1 Análise da carga parasitaria.....	22
3.7.2 Estágios de desenvolvimento de ovos (oograma).....	22
3.7.3 Contagem de ovos nas fezes.....	22
3.7.4 Análise do tegumento .....	23
3.7.5 Avaliação do nerolidol em parasitos <i>ex vivo</i> .....	23
3.8 Tratamento dos dados.....	23
3.9 Considerações éticas .....	24
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5 REFERÊNCIA.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ANEXO .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por helmintos representam um importante problema de Saúde Pública em diversos países. Particularmente, a esquistossomose, denominadas também bilharziose, é endêmica em mais de 70 países. Estima-se a existência, em todo mundo, de mais de 200 milhões de indivíduos infectados e 800 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair infecção. Esta helmintose é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente<sup>1</sup>. No Brasil, a esquistossomose é endêmica em 19 estados. Acredita-se haver, no território nacional, entre 6 e 8 milhões de indivíduos infectados e 26 milhões correm o risco de infecção<sup>2</sup>.

A esquistossomose tem como os principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi*. *Schistosoma mansoni* está presente em mais de 50 países nos continentes africano e americano, onde determina uma infecção denominada esquistossomose mansônica<sup>3</sup>.

*Schistosoma* possui um ciclo de vida complexo, passando e por diversas fases em hospedeiros e ambientes diversificados, com capacidade de adaptação, multiplicação e resistência. As fases do ciclo biológico do *Schistosoma* compreendem dois períodos de vida parasitária: um no hospedeiro intermediário e outro no hospedeiro definitivo. Entre as fases parasitárias há dois períodos de vida livre em meio aquático: as fases de miracídio e cercaria<sup>4,5,6,3</sup>. Em particular, a espécie *S. mansoni*, em geral, realiza ciclo assexuado nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, enquanto que os espécimes adultos são encontrados nos vasos mesentéricos e no sistema porta de mamíferos das ordens Primates, Rodentia, Artiodactyla e Carnivora. O ciclo de vida do *S. mansoni* está representado na **Figura 1**.

A esquistossomose mansônica é transmitida por caramujos de água doce, hermafroditas e pertencentes ao gênero *Biomphalaria* da família Planorbidae. Três espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pela transmissão da esquistossomose no continente americano: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. *Biomphalaria glabrata* é o principal hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil e é a espécie mais estudada devido a sua ampla distribuição geográfica e eficiência na suscetibilidade pelo parasita, apresentando altos índices de infecção natural e experimental<sup>7, 8</sup>. Os vários aspectos patogênicos e patológicos observados na esquistossomose mansônica dependem da interação parasito-hospedeiro nas três fases evolutivas e migratórias do verme no hospedeiro definitivo: esquistossômulo,

verme adulto e ovo. Os ovos e a reação granulomatosa que os envolvem constituem os principais fatores causadores da morbidade. A infecção por *S. mansoni* costuma ser oligossintomática com predominância intestinal; mas pode produzir alterações anatomopatológicas cujo caráter e gravidade cobre extensa gama de situações, o que imprime a essa doença grande polimorfismo e, em muitos casos, prognóstico incerto. Assim, a esquistossomose deve ser encarada como uma doença de múltiplos mecanismos, com lesões diretamente ligadas à presença local do agente etiológico (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos, ovos), alterações hemodinâmicas, alterações de reatividade imunológica, lesões à distância devidas a imunocomplexos, e alterações gerais sobre o organismo, além de interagir e favorecer outras patologias por agentes infecciosos. Nas formas mais graves, há predominância de hepatoesplenomegalia e fibrose periportal. Entre os vários fatores dos quais a patogenia da helmintose está ligada, os mais importantes são a carga parasitária, que influencia diretamente no número de ovos, e a resposta do sistema imunológico de cada hospedeiro <sup>6, 9, 10, 4, 11, 12</sup>.

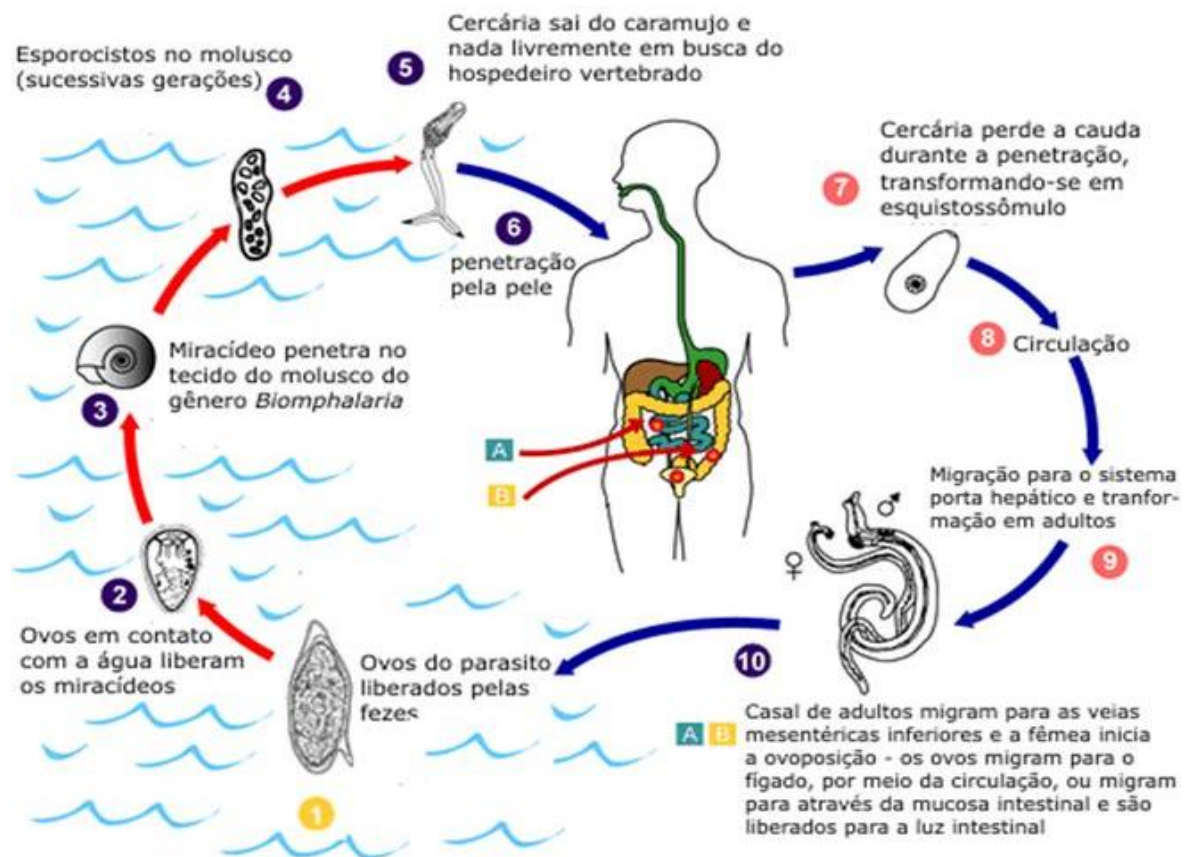


Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Fonte: CVE (2005).

Atualmente a quimioterapia é a forma mais eficaz no controle da esquistossomose<sup>3</sup>. Contudo, infelizmente, existe apenas um fármaco utilizado no controle da esquistossomose: o 2-(ciclo-hexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-

pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona, praziquantel. Este fármaco, administrado oralmente em dose única, atua contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem. O praziquantel tem sido estudado experimentalmente em animais desde a década de 1970, mostrando-se eficaz contra infestações de várias espécies de trematódeos e cestódeos. A ação anti-helmíntica do praziquantel deve-se provavelmente na alteração dos canais de  $Ca^{2+}$  dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia. Como consequência, os helmintos se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado, ao passo que os helmintos intestinais são expelidos<sup>13-16</sup>. O tratamento com praziquantel, comumente realizado nas doses de 40 mg/kg a 60 mg/kg em humanos, é eficaz na redução da morbidade, porém os resultados com o uso deste fármaco têm sido menos promissores do que o esperado. Além de não atuar nas formas jovens do parasita, existem alguns relatos de resistência ao fármaco<sup>17, 18, 19, 13, 20, 14, 4, 21</sup>. Desta forma, a preocupação com desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel justifica-se a pesquisa de novas moléculas para tratamento e profilaxia da esquistossomose.

Considerando a dificuldade na descoberta de esquistossomicidas, a alternativa pode estar nos produtos naturais. Nesse contexto, a busca por compostos naturais ou sintéticos com propriedades esquistossomicidas tem aumentado nos últimos anos e nosso grupo de pesquisa tem contribuído com o relato de substâncias naturais ou sintéticas com atividade em *Schistosoma mansoni*, conforme mostrado na **Tabela 1**, e recentemente revisado<sup>22</sup>. Não obstante, é noção cediça que o desenvolvimento de novos fármacos é dispendioso e pode demorar muitos anos para atingir o mercado. Nesse sentido, é fundamental o uso de substâncias com características farmacológicas e toxicológicas conhecidas e, sobretudo, que já foram aprovadas por Agências Reguladoras.

Tabela 1. Substâncias naturais ou sintéticas com efeito anti-*Schistosoma mansoni*, descritas pelo nosso grupo

Composto	Grupo químico e observações	Referências
Piplartina	Amida isolada da raiz de <i>Piper tuberculatum</i> (Piperaceae)	Moraes et al. (2011) <sup>*23</sup> De Moraes et al. (2012) <sup>*24</sup> De Moraes et al. (2013a) <sup>*25</sup> Campelo et al., (2014) <sup>*26</sup> Veras et al. (2012) <sup>*27</sup>
Epiisopiloturina	Alcaloide isolado de folhas de <i>Pilocarpus microphyllus</i> (Rutaceae)	Leite et al. (2011) <sup>†28</sup> Guimarães et al. (2014) <sup>*29</sup> Guimarães et al., (2015) <sup>*30</sup>
Epiisopilosina	Alcaloide isolado de folhas de <i>P. microphyllus</i>	Rocha et al. (2016) <sup>*31</sup>
Dermaseptina 01	Peptídeo antimicrobiano isolado da pele do anfíbio <i>Phyllomedusa oreades</i>	De Moraes et al. (2011) <sup>*32</sup> De Moraes et al. (2013a) <sup>*25</sup>
Acetato de Carvacrol	Monoterpeno encontrado em óleos essenciais de diversas plantas	De Moraes et al. (2013b) <sup>*33</sup> Fortes et al. (2012) <sup>†34</sup>
Epoxi-Limoneno	Monoterpeno encontrado em óleos essenciais de diversas plantas	De Moraes et al. (2013c) <sup>*35</sup> Nunes et al. (2012) <sup>†36</sup>
Fitol	Diterpeno da molécula de clorofila	De Moraes et al. (2014) <sup>*37</sup> Costa et al. (2012a) <sup>†38</sup>
Nerolidol	Sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais de diversas plantas	Silva et al., (2014a) <sup>*39</sup> Costa et al. (2012b) <sup>†40</sup>
Riparinas	Alcaloide encontrado no fruto verde da <i>Aniba riparia</i> Mez (Lauraceae)	Nunes et al. (2014) <sup>*41</sup> Nunes et al. (2014) <sup>†42</sup>
Cumarinas	Lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico, encontrado em diversas espécies de plantas	Mesquita et al. (2013) <sup>*43</sup> Mesquita et al. (2013) <sup>†43</sup>
Ácido <i>Orto</i> -Hidroxicinêmico	Encontrado em diversas espécies de plantas	Mesquita et al. (2013) <sup>*43</sup>
Casearina	Diterpeno encontrado isolado de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz (Flacourtiaceae)	Freitas et al. (2014) <sup>†44</sup>
Garcinielliptona FC	Benzofenona poliprenilada isolada das sementes de <i>Platonia insignis</i> Mart (Clusiaceae)	Freitas et al. (2014b) <sup>†44</sup> Silva et al. (2015b) <sup>*45</sup>
Cardamonin	Chalcona isolada das folhas de <i>Piper aduncum</i> L. (Piperaceae)	Castro et al. (2015) <sup>†46</sup>
3,7-Dimetil-1-octanol	Monoterpeno encontrado em óleos essenciais de diversas plantas	Mafud et al. (2016) <sup>*47</sup> Freitas et al. (2013) <sup>†48</sup>
Licoflavone B	Flavonoide isolado de raízes de <i>Glycyrrhiza inflata</i> (Fabaceae).	Aleixo de Carvalho et al. (2016) <sup>*49</sup>

\* Artigos completos publicados em periódicos.

† Patentes com registro no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).



Produtos naturais são encontrados em muitos ambientes e produzido por todos os tipos de organismos. Derivados principalmente de plantas, eles têm sido o pilar do tratamento de doenças humanas<sup>50, 51</sup> e a investigação têm-se intensificado para identificar compostos bioativos<sup>52, 53</sup>. As plantas são ricas em uma grande variedade de metabolitos secundários, tais como taninos, terpenos, alcaloides e flavonoides<sup>52</sup>. Os óleos essenciais são altamente enriquecidos em alguns compostos, denominados terpenoides, que possui várias propriedades biológicas e os seus efeitos são caracterizadas por uma série de interações complexas entre as estruturas biológicas<sup>50-53</sup>.

Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol), também conhecido como peruvicol, é um álcool alifático sequisterpeno presentes em óleos essenciais de várias plantas. Nerolidol também é amplamente utilizado na indústria, na fabricação de produtos cosméticos e não cosméticos (por exemplo: xampus, perfumes, detergentes e produtos de limpeza) e como um intensificador de sabor em muitos produtos alimentares<sup>54,55</sup>. Ademais, nerolidol tem sido frequentemente estudado no que diz respeito ao seu potencial terapêutico. De fato, estes estudos demonstram atividade antioxidante<sup>56</sup>, antinociceptivo<sup>57</sup> e antiúlcera<sup>58</sup>. Nerolidol é também ativo contra bactérias e fungos<sup>59-61</sup>. Em parasitas, a ação leishmanicida<sup>62</sup>, tripanossomicida<sup>63</sup>, antimalárica<sup>64</sup> e antibabesia<sup>65</sup> do nerolidol foram descritas. Ressalte-se que o uso do nerolidol tem sido aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* como aditivo alimentar e foi incluído pelo *European Commission* na lista de substâncias seguras<sup>54,55</sup>.

Estudos recentes do nosso grupo relataram o efeito anti-helmíntico do nerolidol contra vermes adultos de *S. mansoni ex vivo*<sup>39</sup>. Nesse caso, nerolidol nas concentrações de 31,2 µM e 62.5 µM causou a morte dos helmintos machos e fêmeas, respectivamente. Análises por microscopia confocal revelaram alterações morfológicas no tegumento dos esquistossomos, cujos efeitos foram diretamente dependentes da concentração e do tempo de incubação. Com o objetivo de dar continuidade nos estudos, no presente trabalho foi avaliada a atividade *in vivo* do terpeno nerolidol em camundongos infectados com *S. mansoni*. Os efeitos do nerolidol foram avaliados com ênfase na carga parasitária, oograma qualitativo e quantitativo, e ovos nas fezes.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito anti-helmintico do terpeno nerolidol em camundongos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni* nas fases adulta e juvenil.

### **2.2 Específicos**

- 1) Avaliar o número de vermes recuperados (carga parasitária);
- 2) Avaliar o efeito do tratamento na oviposição dos parasitas;
- 3) Analisar o tegumento dos helmintos após o tratamento.

### 3 MÉTODO

#### 3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental com abordagem quantitativa.

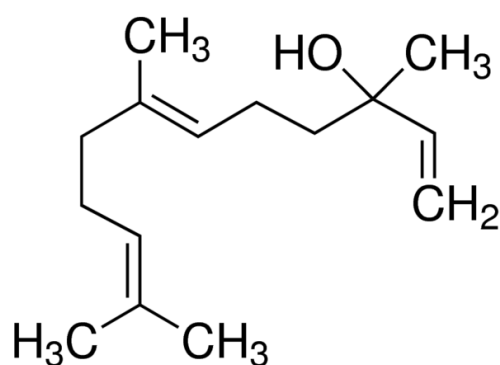
#### 3.2 Local do Estudo

As etapas do presente estudo foram realizadas em diferentes instituições, conforme exposto a seguir:

- a) Núcleo de Enteroparasitas, Instituto Adolfo Lutz: manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni*;
- b) Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade de Guarulhos: ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*;
- c) Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física, Universidade de São Paulo: análise morfológica com Microscópio Eletrônico de Varredura

#### 3.3 Composto

O composto nerolidol racêmico (massa molecular 222.37 g/mol, pureza 98%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estrutura química do terpeno nerolidol.

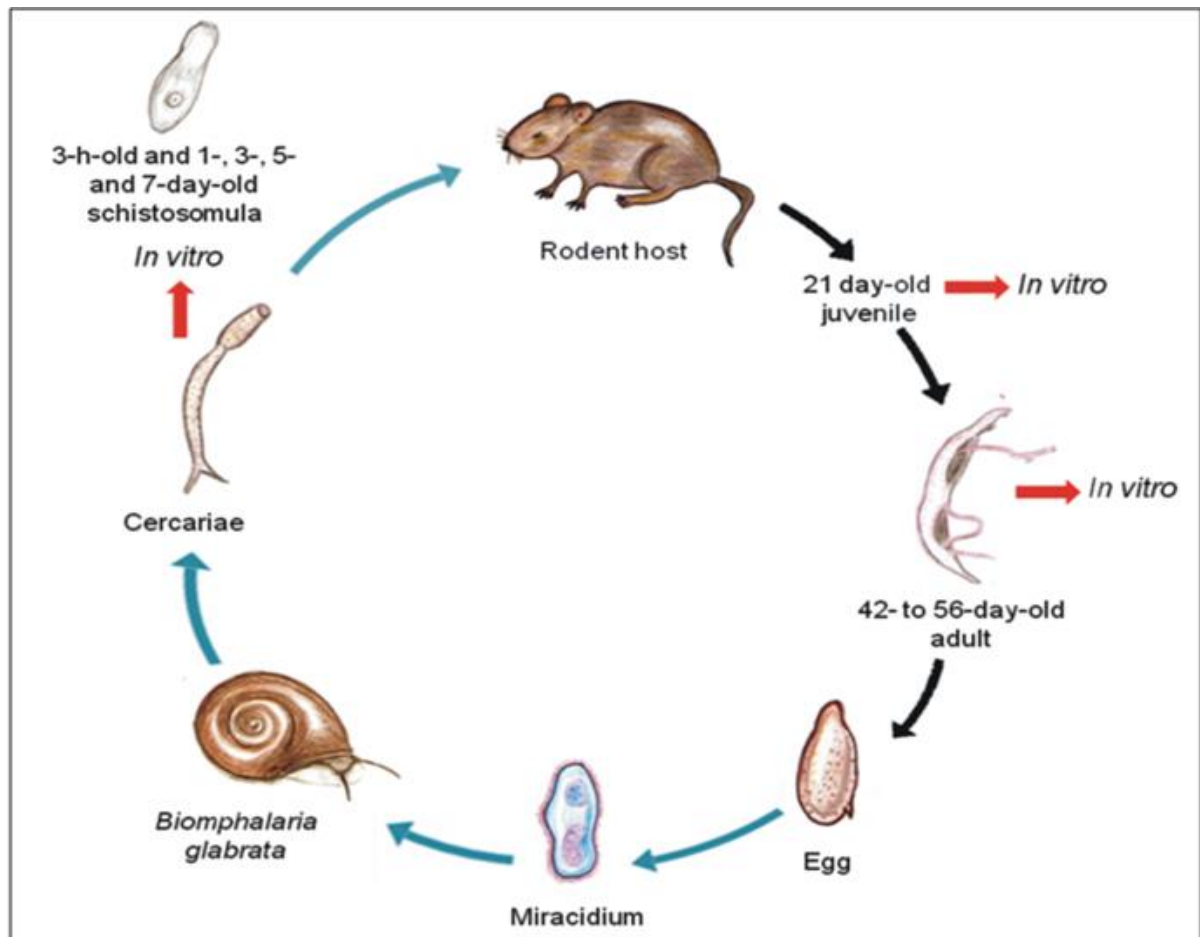
### 3.4 Parasito e animais hospedeiros

A linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 utilizada neste trabalho foi a BH (Belo Horizonte, MG), mantida no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP), sob coordenação do Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto. Os parasitas foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e roedores *Mus musculus* ou *Mesocricetus auratus* (hospedeiro definitivo), como previamente descrito<sup>66</sup> (**Figura 3**). Os experimentos *in vivo* foram realizados Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas da Universidade Guarulhos, cujo estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, Protocolo de Aprovação 031/2017), conforme ANEXO.

### 3.5 Manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*

Para a manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni*, os camundongos foram infectados, subcutaneamente (com seringa de 1 ml), com aproximadamente 180 cercárias. Após 49 dias, os animais foram eutanasiados para a retirada do fígado e obtenção dos miracídios<sup>66</sup>.

Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de cultura de células (placas com 24 poços), contendo água filtrada e 10 miracídios. A exposição do molusco aos miracídios foi realizada sob a luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W), durante 4 horas. Após 30 dias, os moluscos foram colocados sob a luz artificial para a eliminação das cercárias, durante 30 minutos. As cercárias foram utilizadas na infecção dos roedores<sup>66</sup>.



**Figura 3.** Manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Fonte : Moraes J. 2012.

### 3.6 Infecção dos camundongos e design experimental

#### 3.6.1 Tratamento dos animais 49 dias após infecção (verme adulto)

Camundongos foram infectados com cerca de 70 cercárias de *S. mansoni* por imersão da cauda. Sete semanas após a infecção, grupos de dez camundongos foram tratados por via oral com nerolidol previamente solubilizado em óleo mineral, utilizando doses orais únicas de 400, 200 e 100 mg do composto por kg de massa corporal. Nos camundongos controle foram administrado oralmente igual volume de óleo mineral. Em síntese, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo I (n = 10): camundongos infectados e não tratados;
- Grupo II (n = 10): camundongos infectados e tratados com nerolidol 100 mg/kg;
- Grupo III (n = 10): camundongos infectados e tratados com nerolidol 200 mg/kg;

d) Grupo IV (n = 10): camundongos infectados e tratados com nerolidol 400 mg/kg.

Dez dias após tratamento os animais foram eutanasiados para avaliação da terapêutica, conforme especificado a seguir.

### **3.6.2 Tratamento dos animais 21 dias após infecção (verme juvenil)**

Com base na atividade *in vivo* contra esquistossomas adultos, nerolidol foi testado em camundongos que abrigavam *S. mansoni* na fase juvenil (infecção pré-patente). Nesse caso, 21 dias após a infecção, um grupo de 10 camundongos foram tratados com dose oral de 400 mg/kg de nerolidol. Dez camundongos não tratados, mas que receberam o veículo via oral, serviram como grupo controle.

## **3.7 Análise da ação esquistossomicida *in vivo***

Nos experimentos *in vivo*, a ação esquistossomicida em camundongos foi analisada 10 dias após o tratamento com nerolidol. Foram considerados: (a) o número de vermes adultos recuperados em animais submetidos ao tratamento; (b) número de ovos nas fezes; (c) oograma qualitativo e quantitativo.

### **3.7.1 Análise da carga parasitária**

Todos os grupos de animais foram eutanasiados e dissecados. Os parasitas foram removidos do sistema porta- hepático pela técnica de perfusão, sexuais e contados conforme descrito<sup>67</sup>. Vermes recolhidos de todos os grupos foram fixados para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.

### **3.7.2 Estágios de desenvolvimento de ovos (oograma)**

A avaliação da eficácia terapêutica foi baseada na técnica de oogramas quantitativa e qualitativa seguindo critérios previamente descritos<sup>68</sup>. Depois da perfusão do sistema porta, um fragmento do intestino (10 mm) foi cortado e processado para oograma. Os ovos foram então contados e classificados de acordo com diferentes estágios de desenvolvimento, conforme definição: imaturo, maduro, e mortos<sup>68</sup>.

### **3.7.3 Contagem de ovos nas fezes**

Para contagem de ovos nas fezes foi utilizado o método de Kato-Katz <sup>43</sup>. Amostras de fezes foram coletadas de todos os camundongos, nos dois grupos experimentais, e examinados para confrontar seus resultados com os achados do oograma. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz para identificar ovos de *S. mansoni*.

### **3.7.4 Análise do tegumento do *S. mansoni* por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para mostrar as alterações morfológicas em esquistossomas adultos recuperados de camundongos tratados com nerolidol, dois camundongos adicionais foram tratados oralmente com 400 mg/kg de nerolidol e dissecados a 24 e 48 h após o tratamento<sup>37</sup>. Os vermes foram removidos do sistema porta hepático pela técnica de perfusão como descrito<sup>41</sup>, enxaguados duas vezes em solução Tampão Salina fosfato (PBS) e fixados em 1 mL de glutaraldeído a 2,5% (Merck-Millipore, Cotia, SP, Brasil) durante 3-24 h à temperatura ambiente<sup>30</sup>. Em síntese, os espécimes foram secados ao ar, montados em stubs e metalizados com ouro usando um revestidor de pulverização Desk II (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ). As amostras foram então visualizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução JEOL JSM-6460LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) com uma tensão acelerada de 20 kV. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Cecília Salvadori (IF-USP).

### **3.7.5 Avaliação do nerolidol em parasitos ex vivo**

A avaliação *in vitro* do nerolidol foi realizada conforme previamente relatado <sup>70-25</sup>. Os esquistossomas juvenis (21 dias de idade) ou adultos (49 dias de idade), recém-recuperados de hospedeiro roedores, foram lavados e colocados em uma placa de cultura de 24 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) contendo Meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 200 µg/mL de estreptomicina, 200 UI / mL de penicilina (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Os esquistossomas recém-transformados foram obtidos por transformação mecânica usando um misturador de vórtice.

Os parasitas foram cultivados durante 3 h antes do bioensaio em antibióticos contendo meio 169 (Vitrocell) e suplementados com 10% de soro fetal bovino a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Posteriormente, os esquistossomas foram transferidos para microplacas de cultura de células de 24 poços (TPP), contendo aproximadamente 50 parasitas por poço e cultivados em meio 169. Todos os estágios de *S. mansoni* foram mantidos continuamente em meio (com ou sem drogas) por 72h a 37 °C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%. As seguintes concentrações da droga foram avaliadas: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µM. Todos os vermes foram monitorados usando um microscópio invertido.

### **3.8 Tratamento dos dados**

Os testes estatísticos foram realizados com o software GRAPHPAD PRISM (versão 6.0). O teste de Dunnet foi utilizado para analisar a significância estatística das diferenças entre os valores experimentais médios e de controle <sup>37</sup>. Um valor de P <0,05 foi considerado significativo. As concentrações letais de 50% (LC<sub>50</sub>) também foram calculadas usando curvas dose-resposta sigmóides e os intervalos de confiança de 95% estão incluídos entre parênteses <sup>71</sup>.

### **3.9 Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Guarulhos (número de protocolo 031/17, conforme ANEXO). Todos os animais foram tratados em estrita conformidade com as boas práticas de animais, de acordo com a legislação brasileira (Comissão de Ética de Uso de Animais, CEUA, 11.794/2008).



## 4 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão no artigo recentemente publicado no periódico *International Journal of Antimicrobial Agents* (Fator de Impacto 4.307, Qualis A1), conforme a seguir.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Antimicrobial Agents

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

## Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis



Marcos P. Silva <sup>a</sup>, Rosimeire N. de Oliveira <sup>b</sup>, Ana C. Mengarda <sup>a</sup>, Daniel B. Roquini <sup>a</sup>, Silmara M. Allegretti <sup>b</sup>, Maria C. Salvadori <sup>c</sup>, Fernanda S. Teixeira <sup>c</sup>, Damião P. de Sousa <sup>d</sup>, Pedro L.S. Pinto <sup>e</sup>, Ademair A. da Silva Filho <sup>f</sup>, Josué de Moraes <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos, Praça Tereza Cristina, 229, Centro, Guarulhos, SP 07023-070, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciências, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>e</sup> Núcleo de Enteroparasitas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

<sup>f</sup> Faculdade de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 March 2017

Accepted 17 June 2017

## Keywords:

Schistosoma

Schistosomiasis

Antischistosomal compound

Nerolidol

Natural product

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a major public health problem worldwide, especially in poor communities. Since praziquantel is currently the only drug available to treat schistosomiasis, there is an urgent need to identify new antischistosomal drugs. Nerolidol is a sesquiterpene present as an essential oil in several plants that has been approved by the FDA. This study evaluated the in vivo antischistosomal activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis infected with either adult or juvenile stages of *Schistosoma mansoni*. A single dose of nerolidol (100, 200 or 400 mg/kg) administered orally to mice infected with adult schistosomes resulted in a reduction in worm burden and egg production. Treatment with the highest nerolidol dose (400 mg/kg) caused significant reduction in a total worm burden of 70.06% ( $P < 0.001$ ). Additionally, the technique of quantitative and qualitative oograms showed that a single 400 mg/kg nerolidol dose achieved an immature egg reduction of 84.6% ( $P < 0.001$ ). In faecal samples, the Kato–Katz method also revealed a reduction of 75.2% in eggs/g at a dose of 400 mg/kg ( $P < 0.001$ ). Furthermore, scanning electron microscopy revealed that nerolidol-mediated worm killing was associated with tegumental damage. In contrast to activity against adult *S. mansoni* infection, oral treatment with nerolidol 400 mg/kg had low efficacy in mice harbouring juvenile schistosomes. Since nerolidol is already in use globally as a food additive and has a proven safety record, evaluation of this natural compound's potential for treatment of schistosomiasis could be entirely cost effective in the near future.

© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

Schistosomiasis is a major neglected tropical disease caused by blood-dwelling flatworms of the genus *Schistosoma* [1]. It affects more than 200 million people in tropical and subtropical regions of the world, especially in poor communities without access to safe drinking water and adequate sanitation [1,2]. The economic and health effects of schistosomiasis are considerable, and the disease disables more than it kills. In children, schistosomiasis can cause anaemia, stunting and a reduced ability to learn. Chronic schistosomiasis may affect people's ability to work and in some cases can result in death [3]. The current estimate of yearly disability-adjusted life-years (DALYs) for schistosomiasis is 3.4 million [2]. Human infection is due to three main species, namely *Schistosoma*

*mansoni* and *Schistosoma japonicum*, which causes intestinal/hepatic schistosomiasis, and *Schistosoma haematobium*, which results in urogenital disease [1].

Over the last several decades, chemotherapy using praziquantel (PZQ) has been a widely used strategy for the control and treatment of schistosomiasis. However, the drug does not prevent reinfection and, owing to use for more than three decades, the emergence of PZQ-resistant schistosomes is a constant threat. In addition, there is a critical deficiency in its therapeutic profile as it lacks activity against juvenile parasites [4]. Therefore, the search for a new chemotherapy is crucial to effectively control schistosomiasis in the future.

Natural products, especially from medicinal plants, present a diversity of molecules and have been a reliable source of chemotherapeutic agents, including in anthelmintic drug discovery [5,6]. Artemisinin and chloroquine are examples of plant-derived products with important therapeutic value. In recent years, an increasing number of studies have shown that nerolidol, an aliphatic sesquiterpene alcohol found in essential oils of several plants,

\* Corresponding author. Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Cristina, 229, Centro, Guarulhos, SP 07023-070, Brazil.

E-mail addresses: [josuem@usp.br](mailto:josuem@usp.br); [moraesnpdn@gmail.com](mailto:moraesnpdn@gmail.com) (J. de Moraes).



exhibits a variety of biological properties, such as antimicrobial, antitumour, antioxidant, antinociceptive, antiulcer, anti-inflammatory and insecticidal properties (for review see [7]). In addition, nerolidol has demonstrated activity against several species of parasites, including *Plasmodium* [8], *Babesia* [9], *Trypanosoma* [10] and *Leishmania* [11]. It is important to note that nerolidol is used in many food and scented products and has been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) [12,13].

Our group previously demonstrated that nerolidol at 31–62  $\mu\text{M}$  possesses schistosomicidal activity against ex vivo *S. mansoni* adult worms [14]. We also showed that nerolidol caused morphological alterations in the tegument of parasites in a concentration-dependent manner. On the other hand, in vivo studies to determine the chemotherapeutic potential of nerolidol in the treatment of schistosomiasis have not yet been described. The present study investigated the in vivo antischistosomal activity of nerolidol administered by the oral route in mice infected with either adult or juvenile stages of *S. mansoni*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

BALB/c mice were obtained from the Universidade Estadual de Campinas (Campinas, Brazil). For in vivo studies, 3-week-old BALB/c mice were infected with 80 cercariae of *S. mansoni* (BH strain). All animals were kept under environmentally controlled conditions (temperature 25 °C, humidity 70%) and had access to water (municipal tap water supply) and rodent food ad libitum.

### 2.2. Ethics statement

Procedures involving animals were carried out in accordance with Brazilian legislation. The protocol for maintenance of the *S. mansoni* life cycle was approved by the local ethics committee on animal experimentation.

### 2.3. Experimental design

In the first step, to study the dose–response relationship of nerolidol (a mixture of *cis*- and *trans*-nerolidol; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in adult *S. mansoni* infection (patent infection), mice were treated with a single oral dose of nerolidol at 49 days post-infection (p.i.). Nerolidol was mixed in corn oil and was administered to rodents in 100  $\mu\text{L}$  by the oral route. The control group received an equal volume of corn oil only. Mice harbouring a chronic schistosome infection were divided into four experimental groups, with each group consisting of 10 animals treated with a single oral dose as follows: Group I, vehicle-treated control group; Group II, group treated with nerolidol at 400 mg/kg; Group III, group treated with nerolidol at 200 mg/kg; and Group IV, group treated with nerolidol at 100 mg/kg.

Subsequently, on the basis of their in vivo activity against adult schistosomes, nerolidol was tested in mice harbouring juvenile *S. mansoni* (pre-patent infection). In this case, a group of 10 mice was ere treated with a single 400 mg/kg oral dose of nerolidol at 21 days p.i. (pre-patent infection). Ten untreated mice served as controls.

### 2.4. In vivo drug assessment

At 2 weeks post-treatment, mice were euthanised and surviving schistosomes residing in the mesenteric veins and liver were counted and sexed as previously described [15]. Assessment of therapeutic efficacy was also based on the technique of quantitative and qualitative oograms using a fragment of the ascending colon (10 mm) [16]

as well as the Kato–Katz method for quantitative faeces examination [17]. In the oogram pattern, eggs were scored as immature, mature or dead [16].

### 2.5. Scanning electron microscopy (SEM) studies

To determine whether nerolidol can cause morphological alterations in adult schistosomes recovered from mice, two additional mice were orally treated with 400 mg/kg nerolidol and were dissected at 24 h and 48 h post-treatment [15]. Worms were extracted from the mesenteric veins and liver as described above, were rinsed twice in phosphate-buffered saline and were fixed in 1 mL of 2.5% glutaraldehyde (Merck-Millipore, Cotia, SP, Brazil) for 3–24 h at room temperature. Samples were prepared as previously described [18]. Briefly, specimens were air-dried, were mounted on stubs and were metalised with gold using a Desk II sputter coater (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ). Samples were then visualised using a JEOL JSM-6460LV high-resolution scanning electron microscopy (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 20 kV.

### 2.6. In vitro drug assessment

In vitro drug assessment was performed as previously reported [19–21]. Briefly, juvenile (21-day-old) or adult (49-day-old) schistosomes, freshly recovered from a rodent host, were washed and were placed in a 24-well culture plate (TPP, St Louis, MO) containing RPMI 1640 medium (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin and 200 IU/mL penicillin (Vitrocell) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Newly transformed schistosomula were obtained by mechanical transformation using a vortex mixer. Parasites were cultivated for 3 h prior to the bioassay in 169 medium (Vitrocell) containing antibiotics and supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For in vitro bioassays, schistosomula were transferred to 24-well culture microplates (TPP) containing ca. 50 parasites/well and were cultured in medium 169. All stages of *S. mansoni* were maintained continuously in medium (with or without drugs) for 72 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The following drug concentrations were evaluated: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400  $\mu\text{M}$ . All worms were monitored using an inverted microscope.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Dunnett's test was used to analyse the statistical significance of differences between mean experimental and control values [15]. A *P*-value of <0.05 was considered significant. The 50% lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was also calculated using sigmoid dose–response curves, along with the 95% confidence interval (CI) [5].

## 3. Results

First, the dose–response relationship of nerolidol in adult *S. mansoni* infections was evaluated. Groups of 10 mice were treated orally with single doses of nerolidol (100, 200 or 400 mg/kg) at 49 days p.i. Then, on the basis of their in vivo activity against adult schistosomes (patent infection), nerolidol was tested in mice harbouring juvenile *S. mansoni* (pre-patent infection). Furthermore, schistosomula, juveniles and adult *S. mansoni* were each incubated in vitro with nerolidol over a wide concentration range (6.25–400  $\mu\text{M}$ ).



### 3.1. Oral treatment with nerolidol in mice harbouring patent infections significantly reduced worm burden

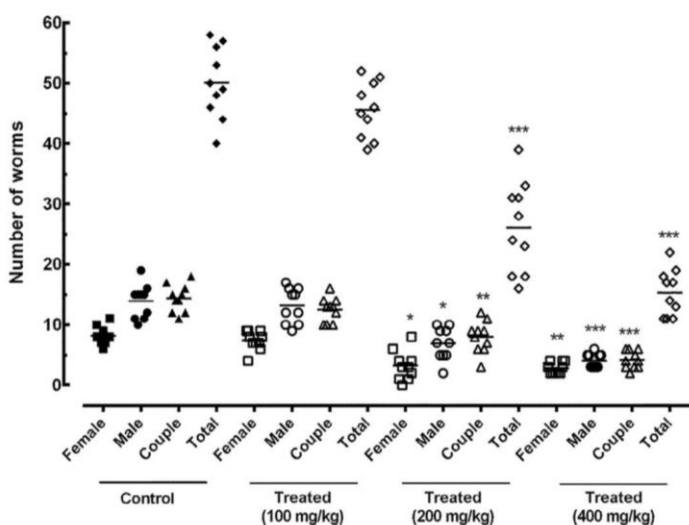
In mice infected by adult *S. mansoni*, there was a significant reduction in worm burden upon oral treatment with nerolidol ( $P < 0.001$ ). The highest activity was observed with a single dose of nerolidol 400 mg/kg, with a total worm burden reduction of 70.06%. At a dose of 200 mg/kg, the total worm burden reduction was 48.8%. At the lowest dose investigated (100 mg/kg), nerolidol showed no significant effect on worm burden (reduction of 10.98%) compared with infected untreated controls. The total, male and female worm burdens following treatment of *S. mansoni* infections with nerolidol are shown in Fig. 1.

### 3.2. Oral treatment with nerolidol in mice harbouring patent infections significantly reduced egg production

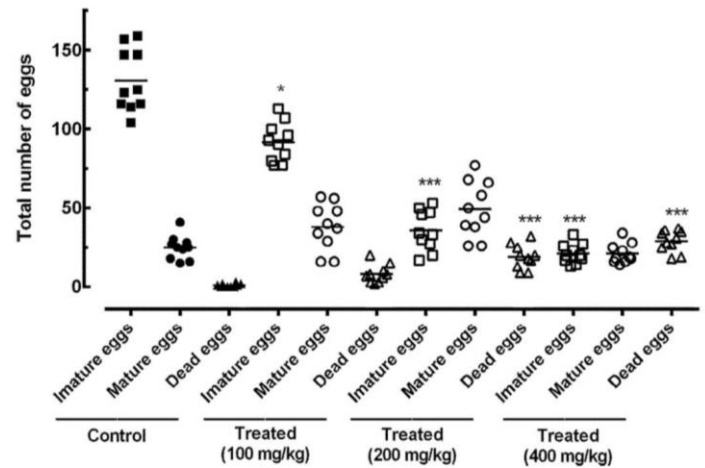
In addition to the in vivo antischistosomal effects described above, oral treatment with nerolidol reduced egg production. The effect of nerolidol (100, 200 and 400 mg/kg) on egg development stages (oogram) and faecal egg load are shown in Figs 2 and 3.

In the wall of the intestine, eggs at all developmental stages were observed in the treated group, but the frequency of immature eggs was significantly lower compared with infected untreated controls. Administration of single doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg achieved reductions in the number of immature eggs of 69.7% and 84.6%, respectively ( $P < 0.001$ ). At a dose of 100 mg/kg, the reduction of immature eggs was 29.89% ( $P < 0.05$ ). The oogram also showed significant increases in the proportion of dead eggs at 200 mg/kg and 400 mg/kg nerolidol ( $P < 0.001$ ), whereas there was no significant reduction in the number of *S. mansoni* eggs with a single dose of 100 mg/kg compared with the control *S. mansoni*-infected mice (Fig. 2).

In faecal samples collected from mice, the Kato–Katz method revealed that nerolidol significantly reduced the number of eggs compared with the infected untreated control group, with reductions of 48.32% ( $P < 0.01$ ) and 75.2% ( $P < 0.001$ ) at doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively (Fig. 3).



**Fig. 1.** Effect on worm burden of a single oral dose of nerolidol administered to mice harbouring a 49-day-old adult *Schistosoma mansoni* infection, stratified by sex. Points represent data from individual mice that were infected and treated with nerolidol, or infected and untreated (control) mice. Horizontal bars represent median values. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with untreated groups.



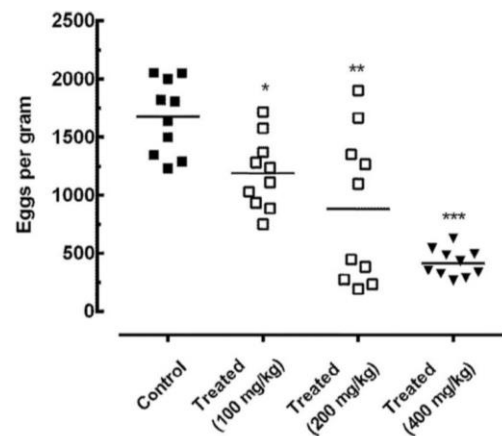
**Fig. 2.** Effect on egg development stages (oogram) of a single oral dose of nerolidol administered to mice harbouring a 49-day-old adult *Schistosoma mansoni* infection. Points represent data from individual mice that were infected and treated with nerolidol, or infected and untreated (control) mice. Horizontal bars represent median values. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with untreated groups.

### 3.3. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with nerolidol

SEM examinations of adult *S. mansoni* recovered from infected untreated mice and nerolidol-treated mice (400 mg/kg) in patent infections are presented in Fig. 4. Nerolidol caused morphological alterations in the tegument both of male and female schistosomes, and all worms showed slight to moderate focal damage of the dorsal surface of the tegument. Male worms showed changes in the tubercles, namely swelling and shortening or even loss of the spines on the surface. There were numerous blebs around the tubercles. In female worms, slight to moderate peeling of the dorsal surface was seen.

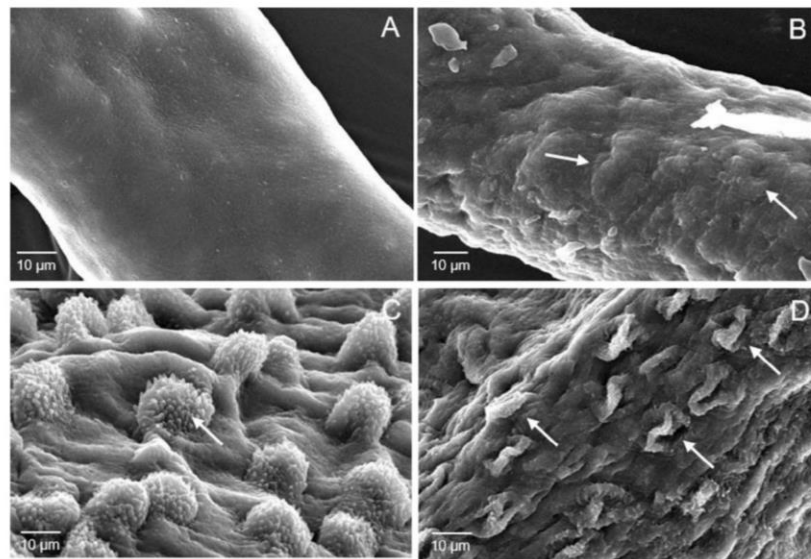
### 3.4. Oral treatment with nerolidol in mice harbouring pre-patent infections had low efficacy in reducing worm burden and egg production

Because nerolidol at a dose of 400 mg/kg was the most potent against *S. mansoni* adults (Figs 1–3), the effects of this compound



**Fig. 3.** Effect on stool egg load of a single oral dose of nerolidol administered to mice harbouring a 49-day-old adult *Schistosoma mansoni* infection. Points represent data from individual mice that were infected and treated with nerolidol, or infected and untreated (control) mice. Horizontal bars represent median values. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  compared with untreated groups.





**Fig. 4.** Scanning electron microscopy (SEM) investigation of adult *Schistosoma mansoni* recovered from mice. Animals harbouring a 49-day-old adult *S. mansoni* infection were treated with a single oral dose of nerolidol 400 mg/kg. Mice were killed at 48 h post-treatment and images were obtained by SEM. (A) Female worms from infected and non-treated animal (control). (B) Female worms from infected animals and treated with nerolidol; tegumental surface showing blebs, swelling and shortening. (C) Male worms from infected and non-treated animal (control); dorsal tegumental surface showing tubercles and spines on the surface. (D) Male worms from infected animals and treated with nerolidol; dorsal tegumental surface showing swelling, shortening and collapse of the tubercles or even loss of the spines on the surface.

on juvenile *S. mansoni* worms were further analysed. However, in contrast to the *in vivo* activity of nerolidol in mice harbouring adult infections, treatment of juvenile *S. mansoni*-infected mice with a single 400 mg/kg oral dose of nerolidol showed a weak reduction in worm burden and eggs compared with the control group. Indeed, moderate, but non-significant, total worm burden reductions of 30.13% were achieved with nerolidol (Fig. 5A). Moreover, analysis of the oogram pattern showed all developmental stages with a predominance of immature eggs and no significant reduction in immature eggs compared with untreated mice (Fig. 5B). In faecal samples, the Kato–Katz technique also revealed a low egg reduction of 26.66% compared with the control group.

### 3.5. Nerolidol exhibited *in vitro* antischistosomal properties against different stages of *Schistosoma mansoni*

The *in vitro* antischistosomal effects of nerolidol on newly transformed schistosomula, juvenile (21-day-old) and adult (49-day-old) *S. mansoni* were evaluated at different concentrations (6.25–400 µM). In summary, LC<sub>50</sub> values of 117.08 µM (95% CI 99.07–126.22 µM), 124.62 µM (95% CI 105.49–143.06 µM) and 84.99 µM (95% CI 75.32–108.61 µM) were calculated for nerolidol on schistosomula, juvenile and adult stages, respectively.

## 4. Discussion

Nerolidol is a terpene approved by the FDA as a food-flavouring agent. It is present in the essential oils of several plants and exhibits a variety of biological and pharmacological properties [7]. Based on available pharmacokinetic and toxicological data, nerolidol is considered safe and it has great potential to be used as a new chemical or therapeutic drug [7,12,13]. A previous study demonstrated that 31–62 µM nerolidol leads to killing of *ex vivo* *S. mansoni* adult worms [14]. In the present study, nerolidol was tested experimentally for the first time in an *S. mansoni*-infected mouse model. Single 100–400 mg/kg oral doses were given to mice 49 days p.i. (patent infection). After that, a single 400 mg/kg oral dose of nerolidol was given to mice 21 days p.i. (pre-patent infection). Worm load, faecal egg load and frequency of egg developmental stages were evalu-

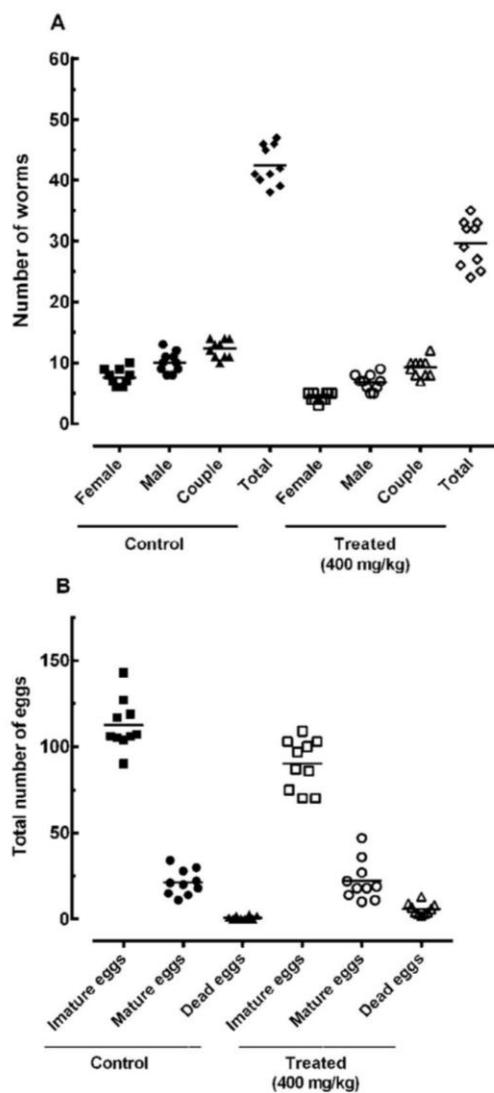
ated and SEM investigations were performed. In addition, different stages of *S. mansoni* (schistosomula, juveniles and adults) were each incubated *in vitro* using nerolidol over a wide concentration range (6.25–400 µM).

Similar to PZQ, which acts primarily against adult worms [22], oral treatment with nerolidol was more effective against adult *S. mansoni* than the juvenile stage. The dose–response relationship of nerolidol in mice harbouring adult schistosomes revealed a significant gradual decrease in the total number of worms and oviposition. Indeed, the highest dose administered (400 mg/kg) resulted in reductions of 70.06% and 84.6% in worm burden and immature eggs, respectively. At this single oral dose, i.e. 400 mg/kg, other studies that used mice harbouring an adult *S. mansoni* infection, the following total worm burden reductions were observed: 0–85% with antiandrogens [23]; 0–80% with aryl ozonides [24]; ca. 20% with triphenylphosphonium derivatives [25]; 0–83% with bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, alphaperoxides and tricyclic monoperoxides [26]; 0–44% with trioxolanes [27]; 12–32% with 3-alkoxy-1,2-dioxolanes [28]; and 0–66% with *N,N'*-diarylurea MMV665852 analogues [29].

Interestingly, data from the current *in vivo* study showed that nerolidol treatment significantly reduced the burden of male worms ( $P < 0.001$ ) compared with female worms ( $P < 0.01$ ). It appears that this compound was slightly more active against male worms, specifically at the dose of 400 mg/kg, unlike other drugs that act preferentially against female schistosomes [15,30] or are equally active against both worm sexes [31], and this result points to a sex-specific interference of the drug with the target or to different drug targets. Similar to the antischistosomal properties of nerolidol, oxamniquine is more active against male than female worms [32]. This phenomenon was not observed when treating juvenile stages of *S. mansoni*.

Schistosomes are parasitic platyhelminths that are dioecious, with the females producing hundreds of eggs per day. Owing to the importance of eggs for the life cycle and for inducing pathogenesis [1], assessment of therapeutic efficacy in *S. mansoni*-infected mice was also based on the technique of quantitative and qualitative oograms as well as the Kato–Katz method for quantitative faecal examination. The oogram is used for obtaining microscopic counts of schistosome eggs, including the different evolutionary stages [27].





**Fig. 5.** Effect of a single oral dose of nerolidol 400 mg/kg administered to mice harbouring a 21-day-old adult *Schistosoma mansoni* infection: (A) effect on worm burden, stratified by sex; and (B) effect on egg development stages (oogram). Points represent data from individual mice that were infected and treated with nerolidol, or infected and untreated (control) mice. Horizontal bars represent median values.

The Kato–Katz technique is a cheap and simple method commonly used for detecting schistosome eggs in stool samples [17]. These methods have been frequently used for selecting new drugs (e.g. [15,18]). Regarding the oogram pattern, treatment with nerolidol in the patent period resulted in a dose-dependent impairment of egg development compared with control treatments. For example, treatment with the highest dose of nerolidol (400 mg/kg) resulted in a decrease in immature eggs of 84.6%. This finding could be attributed to a high reduction in the worm burden as a result of treatment with nerolidol and/or inhibition of oviposition by mature worm pairs. Moreover, there was a significant increase in the number of dead eggs noted in mice treated at doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg. A significant reduction in total eggs and a decrease in total immature eggs with an increase in dead eggs have been described with other antischistosomal compounds [15,33], including PZQ [34].

The tegument is the major interface between the schistosome and its external environment. In addition to providing protection, the tegument has been a major target for antischistosomal drugs [35–37]. SEM analysis revealed morphological alterations on the

tegument of worms, such as disintegration, sloughing and erosion of the surface. The exact mechanism by which nerolidol exerts its effect on *S. mansoni*, especially in the adult stage, is still not clear. However, like other terpenes, nerolidol has high hydrophobicity, allowing it to penetrate across membranes and to interact with intracellular proteins and/or intra-organelle sites [7,38]. It was reported that nerolidol inhibits the in vitro growth of promastigote *Leishmania* species, inhibiting isoprenoid biosynthesis by blocking an early step in the mevalonate pathway [38]. Regarding biological properties of terpenes, some of their activities are associated with their typical lipophiles, loss of ions and reduction of membrane potential, as well as collapse of the proton pump and depletion of the ATP pool [39]. Also, it is known that terpenes are capable of causing morphological changes in the tegument of parasites, and a relationship has been observed between tegumental damage and the death of worms [14,37,40]. Damage to the tegument along the worm's body would have impaired the functioning of the tegument and also destroyed the defence system of the worm, and so it could easily be attacked by the host's immune system [41].

Finally, considering that our earlier in vitro studies demonstrated schistosomicidal activity of nerolidol against adult worms [14], in this study we evaluated the in vitro anthelmintic properties of nerolidol on *S. mansoni* schistosomula and juvenile stages. Nerolidol is more potent on the adult stage ( $LC_{50}$  of ca. 85  $\mu$ M) and has similar activity on schistosomula and juvenile stages ( $LC_{50}$  of ca. 120  $\mu$ M). This feature suggests a different mode of action for nerolidol, but the effect of the compound on different stages of schistosomes in vitro and in vivo remains to be elucidated.

In conclusion, nerolidol is a common food additive approved by the FDA that showed an antischistosomal effect in a murine schistosomiasis model, especially in the period of patent infection. In addition to reducing worm burden, oral treatment with nerolidol resulted in a marked reduction in total egg production, with a decrease in total immature eggs and an increase in dead eggs. Because schistosomiasis control relies on a single drug and there is field evidence for the evolution of drug resistance, there is an urgent need to identify new antischistosomal drugs. Since nerolidol is already in use globally as a food additive and has a safety record, evaluation of the potential of the natural compound for the treatment of schistosomiasis could be entirely cost effective in the near future.

**Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil [grant 2016/22488-3]. MPS and DBR are recipients of a postgraduate fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Procedures involving animals were carried out in accordance with Brazilian legislation [11790/2008]. The protocol for maintenance of the *S. mansoni* life cycle was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Brazil [protocol no. 05/2015].

## References

- [1] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* 2014;383:2253–64.
- [2] GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388:1603–58.
- [3] World Health Organization. Schistosomiasis. Geneva, Switzerland: WHO; 2017. Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. [Accessed 21 March 2017].
- [4] Cioli D, Pica-Mattocchia L, Basso A, Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol* 2014;195:23–9.



- 472 M.P. Silva et al. / International Journal of Antimicrobial Agents 50 (2017) 467–472
- [5] Mafud AC, Silva MP, Monteiro DC, Oliveira MF, Resende JG, Coelho ML, et al. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. *Chem Biol Interact* 2016;244:129–39.
  - [6] de Moraes J. Natural products with antischistosomal activity. *Future Med Chem* 2015;7:801–20.
  - [7] Chan WK, Tan LT, Chan KG, Lee LH, Goh BH. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules* 2016;21:E529.
  - [8] Saito AY, Marin Rodriguez AA, Menchaca Vega DS, Sussmann RA, Kimura EA, Katzin AM. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:641–6.
  - [9] Aboulaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol Int* 2010;59:278–82.
  - [10] Hoet S, Stévigny C, Hérent MF, Quetin-Leclercq J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med* 2006;5:480–2.
  - [11] Arruda DC, D’Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SR. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1679–87.
  - [12] Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food Chem Toxicol* 2008;46(Suppl. 11):S247–50.
  - [13] McGinty D, Letizia CS, Api AM. Addendum to Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food Chem Toxicol* 2010;48(Suppl. 3):S43–5.
  - [14] Silva MP, Oliveira GL, de Carvalho RB, de Sousa DP, Freitas RM, Pinto PL, et al. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules* 2014;19:3793–803.
  - [15] de Moraes J, de Oliveira RN, Costa JP, Junior AL, de Sousa DP, Freitas RM, et al. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease schistosomiasis mansoni. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2617.
  - [16] Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1962;11:201–15.
  - [17] Katz N, Chaves A, Pellegrino JP. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1972;14:397–400.
  - [18] Guimarães MA, de Oliveira RN, Vêras LM, Lima DF, Campelo YD, Campos SA, et al. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003656.
  - [19] de Moraes J, Dario BS, Couto RA, Pinto PL, da Costa Ferreira AM. Antischistosomal activity of oxindolimine–metal complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6648–52.
  - [20] Carvalho AA, Mafud AC, Pinto PL, Mascarenhas YP, de Moraes J. Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:372–4.
  - [21] de Moraes J, Keiser J, Ingram K, Nascimento C, Yamaguchi LF, Bittencourt CR, et al. In vitro synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. *Curr Med Chem* 2013;20:301–9.
  - [22] Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol* 1986;61:294–303.
  - [23] Keiser J, Vargas M, Vennerstrom JL. Activity of antiandrogens against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1991–5.
  - [24] Keiser J, Ingram K, Vargas M, Chollet J, Wang X, Dong Y, et al. In vivo activity of aryl ozonides against *Schistosoma* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1090–2.
  - [25] Spivak AY, Keiser J, Vargas M, Gubaidullin RR, Nedopekina DA, Shakurova ER, et al. Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulonic acid against *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem* 2014;22:6297–304.
  - [26] Ingram K, Yaremenko IA, Krylov IB, Hofer L, Terent’ev AO, Keiser J. Identification of antischistosomal leads by evaluating bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, alphasperoxides, and tricyclic monoperoxides. *J Med Chem* 2012;55:8700–11.
  - [27] Cowan N, Yaremenko IA, Krylov IB, Terent’ev AO, Keiser J. Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine derivatives against *Schistosoma mansoni*. *Bioorg Med Chem* 2015;23:5175–81.
  - [28] Ingram K, Schiaffo CE, Sittiwong W, Benner E, Dussault PH, Keiser J. In vitro and in vivo activity of 3-alkoxy-1,2-dioxolanes against *Schistosoma mansoni*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1979–86.
  - [29] Cowan N, Dätwyler P, Ernst B, Wang C, Vennerstrom JL, Spangenberg T, et al. Activities of *N,N'*-diarylurea MMV665852 analogs against *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1935–41.
  - [30] Keiser J, Chollet J, Xiao SH, Mei JY, Jiao PY, Utzinger J, et al. Mefloquine—an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e350.
  - [31] Allam G, Abuelsaad AS. In vitro and in vivo effects of hesperidin treatment on adult worms of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol* 2014;88:362–70.
  - [32] Foster R, Mesmer ET, Cheetham BL, King DF. The control of immature *Schistosoma mansoni* in mice by UK 3883, a novel 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative. *Ann Trop Med Parasitol* 1971;65:221–32.
  - [33] Eraky MA, El-Kholy AA, Rashed GA, Hammam OA, Moharam AF, Abou-Ouf EA, et al. Dose–response relationship in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult stages following limonin treatment in experimentally infected mice. *Parasitol Res* 2016;115:4045–54.
  - [34] El-Feky GS, Mohamed WS, Nasr HE, El-Lakkany NM, Seif El-Din SH, Botros SS. Praziquantel in a clay nanoformulation shows more bioavailability and higher efficacy against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3501–8.
  - [35] Moraes J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales AJ, editor. *Current topics in tropical medicine*. Rijeka, Croatia: InTech; 2000. p. 333–58.
  - [36] Moraes J, Nascimento C, Lopes PO, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, et al. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of piplartine. *Exp Parasitol* 2011;127:357–64.
  - [37] de Moraes J, Carvalho AA, Nakano E, de Almeida AA, Marques TH, Andrade LN, et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 2013;112:603–10.
  - [38] Camargos HS, Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, Dorta ML, Alonso A. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC<sub>50</sub> values. *PLoS ONE* 2014;9:e104429.
  - [39] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446–75.
  - [40] de Moraes J, Almeida AA, Brito MR, Marques TH, Lima TC, Sousa DP, et al. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. *Planta Med* 2013;79:253–8.
  - [41] Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, Kangwanrangsan N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol Int* 2005;54:177–83.

## 5 REFERÊNCIAS

- 1 Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(7):411-425.
- 2 Amaral R, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(1):79-85.
- 3 Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2014; 383: 2253-2264.
- 4 Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006; 368(9541):1106-1118.
- 5 Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1212-1220.
- 6 Blanchard TJ. Schistosomiasis. *Travel Med Infect Dis.* 2004; 2(1):5-11.
- 7 Morgan JAT, Dejong RJ, Snyder SD, Mkoji GM, Loker ES. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology.* 2001; 123:S211-S228.
- 8 Paraense WL. The schistosome vectors in Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(Suppl): 7-16.
- 9 Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev.* 2004; 201:156-167.
- 10 Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol.* 2006; 13:81-100.
- 11 Secor WE. Interactions between schistosomiasis and infection with HIV-1. *Parasite Immunol.* 2006; 28(11): 597-603.



- 12 Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(2):148-154.
- 13 Doenhoff MJ, Kimani G, Cioli D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitol Today.* 2000; 16(9):364-366.
- 14 Cioli D, Pica-Mattocchia L. Praziquantel. *Parasitol Res.* 2003; 90(Supp 1): S3-S9.
- 15 World Health Organisation. The control of schistosomiasis. *Tech Rep Ser.* 1985; 728:1- 113.
- 16 World Health Organisation. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Tech Rep Ser.* 2002; 912:1-57.
- 17 Bennett JL1, Day T, Liang FT, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol.* 1997; 87(3):260-7.
- 18 Cioli D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol.* 2014; 195: 23-29.
- 19 Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol.* 2001; 31(11):1227-1235.
- 20 Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Méd.* 2002; 96(5):465-469.
- 21 Fenwick A, Webster JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(6):577-582.
- 22 De Moraes J. Natural products with antischistosomal activity. *Future Med Chem.* 2015; 7(6):801-20. Review

23 Moraes Jd, Nascimento C, Lopes PO, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, Kawano T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. Exp. Parasitol. 2011; 127(2): 357-364.

24 De Moraes J, Nascimento C, Yamagushi LF, Kato MJ, Nakano E. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. Exp Parasitol. 2012; 132(2):222-227.

25 De Moraes J, Keiser J, Ingram K, Nascimento C, Yamaguchi LF, Bittencourt CR et al. *In vitro* synergistic interaction between amide pipartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. Curr Med Chem. 2013a; 20: 301-309.

26 Campelo YDM, Mafud AC, Vêras LMC, Guimarães MA, Yamaguchi LF, Lima DF et al. Synergistic effects of *in vitro* combinations of pipartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. Biomed Pharmacother. 2017; 88:. 488-499, 2017.

27 Veras LM, Guimaraes MA, Campelo YD, Vieira MM, Nascimento C, Lima DF, et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. Curr. Med. Chem. 2012; 19: 2051-2058.

28 Leite et al. Processo de obtenção da epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias. Patent PI 0904110-9 A2, 31 de maio 2011.

29 Guimarães MA, Campelo YD, Vêras LM, Colhone MC, Lima DF, Ciancaglini P et al. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. J. Biomed. Nanotechnol. 2014; 14: 4519-4528.

30 Guimarães MA, de Oliveira RN, Vêras LM, Lima DF, Campelo YD, Campos SA, et al. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(3):e0003656.

31 Rocha JA, Andrade IM, Vêras LM, Quelemes PV, Lima DF, Soares MJ, et al. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. *Phytother Res.* 2017; 31(4):624-630.

32 De Moraes J, Nascimento C, Miura L.M, Leite JR, Nakano E, Kawano T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. *Chem Biodivers.* 2011; 8(3):548-558.

33 De Moraes J, Carvalho AAL, Nakano E, Almeida AAC, Marques THC, Andrade LN, Freitas RM, Souza DP. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2013b; 112(2):603-607.

34 Fortes et al., Aplicações do acetato de carvacrol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose. Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número do Processo N<sup>o</sup>: BR 10 2012 005122 0, 2012.

35 Moraes Jd, Almeida AA, Brito MR, Marques TH, Lima TC, Sousa DP et al. Anthelmintic activity of a natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. *Planta. Med.* 2013c ; 79 : 253-258.

36 Nunes et al. Aplicação farmacêutica do epóxi-limoneno no tratamento da esquistossomose - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número De Processo N<sup>o</sup>: BR 10 2012 006336 0, 2012.

37 De Moraes J, De Oliveira RN, Costa JP, Junior AL, De Sousa DP, Freitas RM, Allegretti SM, Pinto PL. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1): e261.

38 Costa et al. Aplicações do fitol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de Processo N<sup>o</sup>: BR 10 2012 012723 7, 2012a.

39 Silva MP, Oliveira GL, De Carvalho RB, De Sousa DP, Freitas RM, Pinto PL, De Moraes J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*. 2014a; 19(3):3793–3803

40 Costa et al. Aplicações em formulações farmacêuticas do nerolidol para tratamento da esquistossomose - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número do Processo Nº: BR 10 2012 006331 0, 2012b.

41 Nunes et al. BR1020130289272. Uso das riparinas em formulações farmacêuticas para tratamento da esquistossomose e outras doenças negligenciadas. Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Protocolo Nº: 000222/2013. 2013.

42 Nunes et al. Design, synthesis, and antiparasitic evaluation of riparins and its structural correlation with praziquantel. *Curr. Med. Chem.*, 2016, In Press.

43 Mesquita AKF, Machado KC, Nunes LCC, Moraes Jd, Freitas, RM. Estudo prospectivo tecnológico e científico do potencial anti-*Schistosoma mansoni* da cumarina e do ácido o-hidroxicinâmico. *Cad. Prospec.*, v. 6, p. 386-397, 2013.

44 Freitas et al. Aplicações do 3,7-dimetil-1-octanol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de Processo Nº: BR 10 2013 007342 0, 2013.

45 Silva AP, Silva MP, Oliveira CG, Monteiro DC, Pinto PL, Mendonça RZ, et al. Garcinielliptone FC: Antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Toxicol. in Vitro*, 2015b; 29: 681-687.

46 de Castro CC, Costa PS, Laktin GT, de Carvalho PH, Geraldo RB, de Moraes J, et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *Phytomedicine*, 2015; 22; 921-928.

47 Mafud AC, Silva MP, Monteiro DC, Oliveira MF, Resende JG, Coelho ML et al. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. Chem Biol Interact 2016; 244: 129-139.

48 Freitas et al. Aplicações do 3,7-dimetil-1-octanol em formulações farmacêuticas para o tratamento da esquistossomose - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de Processo Nº: BR 10 2013 007342 0, 2013.

49 Aleixo de Carvalho LS, Geraldo RB, de Moraes J, Silva Pinto PL, de Faria Pinto P, Pereira Odos S Jr, Da Silva Filho AA. Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae). Exp. Parasitol. 2016; 159; 207-214.

50 Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol Res. 2003 ; 2, 55–62.

51 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 2012 ;75, 311–335.

52 Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 4, 564-82.

53 Chan WK, Tan LTH, Chan KG, Lee LH, Goh BH. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. Molecules. 2016, 21, 529

54 Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). Food Chem Toxicol. 2008 ; 46 Suppl 11:S247-50

55 McGinty D, Letizia CS, Api AM. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). Food Chem Toxicol. 2010 ; 48 Suppl 3:S43-5.

- 56 Nogueira Neto JD, de Almeida AA, da Silva Oliveira J, Dos Santos PS, de Sousa DP, de Freitas RM. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. *Neurochem Res.* 2013; 38(9):1861-70.
- 57 Koudou J, Abena AA, Ngaissona P, Bessièrè JM. Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii*. *Fitoterapia.* 2005; 76(7-8):700-3.
- 58 Klopell FC, Lemos M, Sousa JP, Comunello E, Maistro EL, Bastos JK, de Andrade SF. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Z Naturforsch C.* 2007; 62(7-8):537-42.
- 59 Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 10,3357-60.
- 60 Park MJ, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, Choi IG. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia.* 2009; 80(5):290-6.
- 61 Johann S, Oliveira FB, Siqueira EP, Cisalpino PS, Rosa CA, Alves TM, Zani CL, Cota BB. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2012 ; 8,843-51.
- 62 Arruda DC, D'Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SR. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ;5, 1679-87.
- 63 Hoet S, Stévigny C, Hérent MF, Quetin-Leclercq J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 2006; 5,480-2.
- 64 Lopes NP, Kato MJ, Andrade EH, Maia JG, Yoshida M, Planchart AR, Katzin AM. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *J Ethnopharmacol.* 1999 ; 30;67(3):313-9.
- 65 Abou Laila, M Siva kumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol Int.* 2010; 59(2),278-82.

66 Moraes J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. ed. Current Topics in Tropical Medicine. InTech. Rijeka; 2012. 333-358.

67 Smithers SR, Terry RJ (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. Parasitology 55: 695–700

68 Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS (1962) New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am J Trop Med Hyg 11: 201–215

69 Katz N, Chaves A, Pellegrino JP (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 14: 397–400.

70 de Moraes J, Dario BS, Couto RA, Pinto PL, da Costa Ferreira AM. Antischistosomal Activity of Oxindolimine-Metal Complexes. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 6648-6652.

71 Carvalho AA, Mafud AC, Pinto PL, Mascarenhas YP, de Moraes J. Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel. Int J Antimicrob Agents 2014; 44: 372-374.

## 6 Anexos



Guarulhos, 20 de Março de 2017.


Exmo. Sr.

Josué de Moraes

Referência: Aprovação de Pesquisa

Certificamos que a pesquisa intitulada "Avaliação da atividade anti-helmíntica de fármacos e compostos de origem natural", registrada com protocolo nº 031/17, sob responsabilidade de Josué de Moraes – que envolve utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Guarulhos – UnG, em 20 de Março de 2017.

<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	20/03/2017 à 01/02/2020
<b>Espécie/Linhagem</b>	Camundongo
<b>Nº de animais</b>	200
<b>Peso/Idade</b>	20 gramas / 21 dias
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Origem</b>	Biotério

  
 Prof. Dr. Gustavo Aparecido dos Santos  
 Comissão De Ética No Uso De Animais da  
 Universidade Guarulhos – CEUA  
 Vice-Coordenador