



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO DA ALGA
Laurencia dendroidea E ELATOL EM *Caenorhabditis elegans*

Desirée Hernandes Barros Lopes

Macaé

Fevereiro de 2016

Desirée Hernandes Barros Lopes

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DO EXTRATO DA ALGA
Laurencia dendroidea E ELATOL EM *Caenorhabditis elegans*

Monografia Apresentada ao Curso
de Farmácia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro –
Campus Macaé como um dos
requisitos para obtenção do título de
farmacêutico

Orientadores: Júlia Peralta Gonçalves

Aleksandra Menezes de Oliveira

Macaé

Fevereiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, eu agradeço a Deus que me sustentou ao longo de uma extensa caminhada que leva a vitória. Agradeço a Ele que em seu infinito amor me direcionou e guiou ao longo da minha graduação e minha vida. Obrigada Senhor por todos os momentos e principalmente pelos difíceis em que o Senhor não me deixou esquecer quem eu sou.

À minha mãe que é meu exemplo nesta terra e todos os meus esforços até aqui dedico a ela que com seu amor me ensinou tudo que sei. Ao meu pai que esteve comigo e me ajudou até aqui. E a toda minha família que eu amo.

Aos meus amigos fieis, que estiveram ao meu lado nessa jornada. Agradeço especialmente, a Joyce que tem sido minha irmã e farol em dias nublados, sua amizade e amor eu sei que vão me guiar pra sempre. Agradeço a Thami por ser minha amiga fiel desde sempre e pra sempre e que eu amo. Agradeço ao Gustavo que viu meus sufocos e sempre tinha um “já está acabando, cara” pra me dizer, nem sabe o quanto me ajudou, sua amizade é um presente. E por ultimo e não menos importante aos meus amigos frutos da UFRJ-MACAÉ, devia dedicar uma página inteira ao Vítor, que não é muito de usar palavras pra demonstrar, mas faz melhor que isso ele tem atitudes de um amigo. Quando eu ficar rica te darei todos os lanches do Mc Donald. Agradeço a minha amiga Lívia que me é fiel e eu a ela, e que eu adotei como irmã pra vida toda. Além desses, agradeço muito a Brenda que se mostrou uma amiga e muito boa ouvinte, a Thienne que sempre esteve ao meu lado e com gritos ou sem gritos mora no meu coração e por fim a Thais

Às minhas orientadoras, Júlia e Alek. Agradeço de todo o coração e se não fosse por vocês não estaria aqui. Obrigada pela paciência, compreensão, carinho, auxílio e por tanto conhecimento que me deram. E principalmente a Júlia por ter toda paciência em me ensinar e me ajudar. Obrigada por ter sido a melhor orientadora do mundo.

Aos meus professores, todos de uma forma maravilhosa contribuíram para a profissional de excelência que estou me tornando e com seus ensinamentos me colocaram onde eu estou. Agradeço também aos técnicos do Laboratório de Microbiologia que me auxiliaram em tantas coisas para que eu

pudesse chegar aqui, e um agradecimento especial a Jaci que estava sempre pronta a ajudar.

E por fim agradeço a minha banca de TCC que prontamente se dispôs a me avaliar. Obrigada por aceitar o convite.

E por fim agradeço a FAPERJ, CNPQ e PIBIC-UFRJ pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da morfologia dos nematoides

Figura 2: Ilustração da cutícula de nematoides

Figura 3: Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. As setas indicam o tempo decorrente de cada etapa de desenvolvimento do helminto.

Figura 4: - Morfologia de *C.elegans* adulto não tratado e tratado com DMSO 0,1%

Figura 5: Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 25 e 50 ng/ml.

Figura 6: Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 100 ng/ml.

Figura 7: Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 200 ng/ml

Figura 8: Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com elatol 25 e 50 ng/ml.

Figura 9: Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com elatol 100 e 200 ng/ml.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual de sobrevivência de formas adultas de *C. elegans* após tratamento com o extrato FOR de *Laurencia dendroidea*. Resultado de 3 dias de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três a cinco experimentos em triplicata. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados ($P > 0,05$; One-way ANOVA, Newman-Keuls pós-teste).

Gráfico 2 - Percentual de sobrevivência de formas adultas de *C. elegans* após tratamento com o metabólito elatol de *Laurencia dendroidea*. Resultado de 3 dias de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três a cinco experimentos em triplicata. O asterisco significa diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados e o controle ($P < 0,05$; One-way ANOVA, Newman-Keuls pós-teste).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade dos antihelmínticos em alguns helmintos transmitidos pelo solo

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Nematóide.....	12
1.2 Helmintíases.....	13
1.3 Helmintíases no mundo.....	14
1.4 Helmintíases no Brasil.....	16
1.5 Tratamento das Helmintíases.....	17
1.6 <i>Laurencia dendroidea</i>	20
1.7 Elatol.....	20
1.8 <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
2. Justificativa.....	22
3. Objetivo Geral.....	25
4. Metodologia.....	26
4.1 Cultivo e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
4.2 Avaliação da atividade do extrato bruto de <i>Laurencia dendroidea</i> em formas adultas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
4.3 Análise morfológica do efeito do extrato de <i>L. dendroidea</i> e elatol em <i>C. elegans</i> adulto por microscopia de Luz.....	27
5. Resultados.....	29
5.1 Efeito do extrato FOR em <i>C. elegans</i> adultos.....	29
5.2 Efeitos do elatol na sobrevivência de <i>C. elegans</i> adulto.....	30
5.3 Efeitos na morfologia dos <i>C. elegans</i>	31

6.Discussão.....	39
7.Conclusão.....	41
8.Referências Bibliográficas.....	42

Resumo

A ocorrência de parasitoses em diversas regiões do mundo é bem elevada. Segundo a OMS cerca de quatro habitantes no planeta possui alguma parasitose causada por um helminto. Os casos de helmintíases no Brasil são bem frequentes e se dão devido a inúmeros fatores como as condições precárias de saneamento básico, nível sócio econômico, grau de escolaridade e os hábitos de higiene da população local. O arsenal terapêutico disponível para o tratamento das helmintíases encontra-se bastante reduzido, e o surgimento de cepas resistentes aos anti-helmínticos vem dificultando ainda mais o tratamento e prevenção destas parasitoses. Muitos produtos naturais são, tradicionalmente, conhecidos como possuidores de atividade anti-helmíntica, necessitando que seus efeitos sejam comprovados. Pesquisas demonstram que extratos brutos de diferentes espécies de *Laurencia sp.* possuem atividades contra parasitos; é relatada sua atividade antibacteriana, antifúngica, anti-leishmaniose, anti-trichomonal, anti-helmíntica, antimaláricas, anti-viral, analgésica, anti-inflamatória, anti-coagulante e antioxidante. Entretanto, sua possível atividade anti-helmíntica ainda não foi estudada. O *Caenorhabditis elegans* é um excelente modelo experimental para testar atividade anti-helmíntica, pois é de fácil cultivo e baixo custo. O objetivo do trabalho realizado foi avaliar o potencial anti-helmíntico do extrato bruto obtido da alga *Laurencia dendroidea* e de um dos seus metabólitos, o elatol, em *C. elegans* adulto. Foi mantida em laboratório a cepa N2 de *C. elegans* de acordo com Brenner (1974). Nas placas contendo cerca de 30 adultos de *C. elegans* foram adicionadas concentrações crescentes do extrato FOR (25 ng/mL; 50 ng/mL; 100 ng/mL; 200 ng/mL e 400 ng/ml) e do Elatol (25, 50ng/ml, 100ng/ml, 200 ng/ml e 400 ng/ml). O período de incubação foi de 3 dias. A condição DMSO 0,1% foi utilizada, pois este foi o diluente do FOR e Elatol. Para o cálculo da porcentagem de sobrevivência ela foi plotada em função da concentração dos compostos (GraphPad Software, Inc., EUA). As alterações morfológicas causadas pelo extrato ou elatol em *C. elegans* adulto foram avaliadas por microscopia óptica. Nos ensaios com FOR, em nenhuma das concentrações testadas foi observada alteração significativa da sobrevivência de *C. elegans* adulto ($P > 0,05$, One-Way ANOVA, Bonferroni pós-teste). Nos ensaios utilizando o metabólito majoritário Elatol, houve diminuição significativa

da sobrevivência de *C. elegans* adulto nas concentrações de 100 ng/mL e 200 ng/mL ($P < 0,05$, One-Way ANOVA, Bonferroni pós-teste). O DMSO 0,1% não alterou a sobrevivência de *C. elegans*. As análises por microscopia óptica, demonstraram que os adultos, no experimento controle apresentavam sua cutícula íntegra e abertura oral e esôfago inalterados. O mesmo foi observado para os helmintos em DMSO 0,1%. Os helmintos tratados com o extrato FOR 25ng/ml apresentaram alterações cuticulares, como o pregueamento e desprendimento da cutícula que estava visivelmente disforme. Além disso, a abertura oral e esôfago dos helmintos se encontravam alteradas quando comparadas com o controle e em todas as outras concentrações foram encontradas alterações. Os helmintos tratados com elatol 25,100 e 200 ng/mL apresentavam desprendimento da cutícula e a presença de vesículas na sua superfície, corroborando com os dados obtidos nos percentuais de sobrevivência.

Introdução

1.1. Nematoides

Os nematoides conhecidos, popularmente, com “vermes cilíndricos”. São organismos multicelulares, pseudocelomados, que apresentam o corpo alongado, com extremidade anterior e posterior afiladas, sem segmentação e com simetria bilateral, o que confere a estes um eficiente plano de organização corporal (ROBERTS & JANOVY, 2009).

Os nematoides são pequenos e cerca de 75% de todas as espécies são de vida livre e habitam água do mar ou água doce, sendo assim não conferem nenhum risco a saúde humana, entretanto. Alguns são parasitos de importância médica e veterinária, outros são responsáveis por grandes prejuízos na agricultura (MELO *et al.*, 2015)

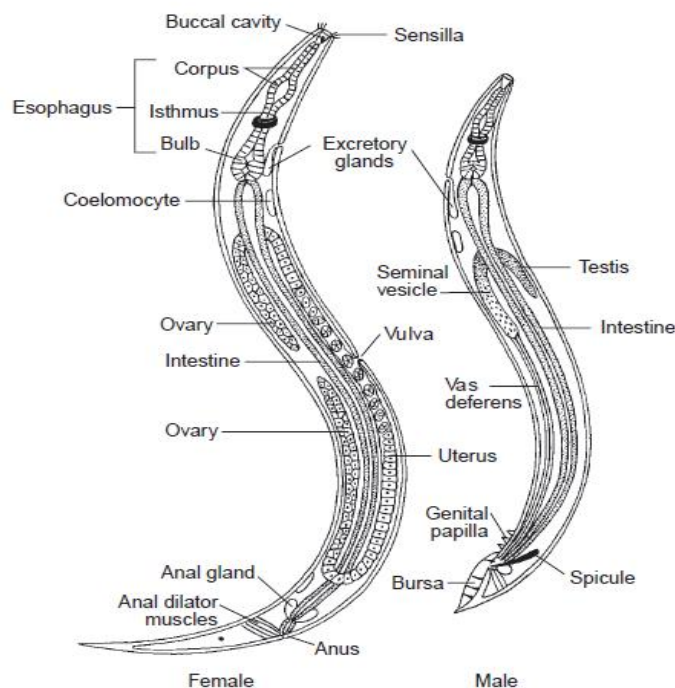


Figura 3 - Ilustração da morfologia dos nematoides

A parede do corpo dos nematoides é constituída por uma cutícula, hipoderme e musculatura. A cutícula é uma cobertura externa, ela reveste toda a cavidade bucal, esôfago, ânus, cloaca, poro excretor e vagina. A cutícula é uma camada de extrema importância e é essencial na evasão da resposta imune em parasitas (ROBERTS & JANOVY, 2009)

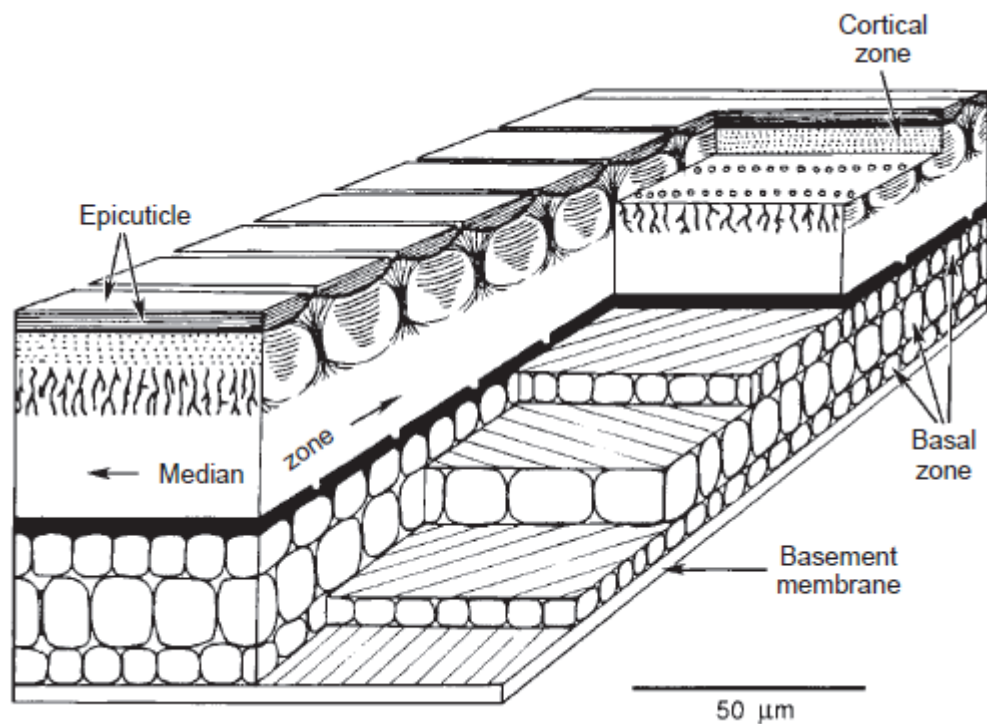


Figura 4 - Ilustração da cutícula de nematoides

A hipoderme é um sincício que se localiza abaixo da membrana basal da cutícula, estando localizadas as organelas celulares. Uma função de grande importância da hipoderme é a síntese e secreção de cutícula. (ROBERTS & JANOBY, 2009)

A musculatura somática está por todo o corpo do nematoide. As contrações ocorrem devido as porções contrateis e não contrateis das células do corpo e dos miócitos. Essas células, os miócitos contem núcleo, mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático entre outras organelas. A contração dos filamentos do musculo estriado ocorre com deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina, semelhante ao modelo Hanson-Huxley (ROBERTS & JANOBY, 2009)

1.2. Helmintíases

As helmintíases são doenças caracterizadas por manifestações clínicas diversas e podem se apresentar sob forma assintomática a leve e sob formas

mais graves e severas. Os sintomas podem variar de inespecíficos para as formas mais leves, como anorexia, distúrbios do sono, náuseas, vômitos e diarreia. Porém nas formas mais severas alguns sintomas são bem característicos como: desnutrição decorrente de lesões nas mucosas e exsudação intestinal causada por *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*; alteração do metabolismo de sais biliares causado por hemorragias severas causadas por *Necator americanus* e *Trichuris trichiura*; entre outras manifestações específicas (BRAZ *et al.*,2015)

Com base no ciclo biológico, os helmintos podem ser subdivididos em: bio-helmintos (é necessária a utilização de um hospedeiro intermediário) e geo-helmintos (utilizam o solo para seu desenvolvimento) (HU *et al.*, 2013). No caso dos geo-helmintos os ovos ou larvas irão se tornar hábeis para infectar em condições ideais de clima e umidade (DE SOUZA *et al.*,2002). As helmintíases causadas pelos geo-helmintos estão correlacionadas com o nível socioeconômico, sendo assim são perceptíveis elevadas taxas de prevalência em países de baixo desenvolvimento socioeconômico em que o saneamento básico é precário e o acesso a água segura e limpa é dificultado (ZIEGELBAUER *et al.*, 2012)

Entre os parasitos que podem habitar o trato gastrointestinal humano estão os que pertencem aos filós *Platyhelminthes*, *Nematoda*, *Acantocephala*. Diversos fatores são importantes para a transmissão de parasitos. O uso de alimentos e água contaminados podem transmitir alguns parasitos como *Taenia solium*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis*. Outros são transmitidos por larvas presentes no solo como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis* (DE ANDRADE *et al.*,2010)

O *Ascaris lumbricoides* é o responsável pela helmintíase mais disseminada em escala mundial e possui alta prevalência em países de clima tropical e com precárias condições de saneamento. A fêmea do parasita libera um grande número de ovos por dia o que facilita sua disseminação e também seu diagnóstico devido à liberação intermitente dos ovos. O *E. vermiculares* tem diagnóstico rápido devido ao sintoma clássico da parasitose provocada

pelo helminto que é o prurido anal devido a presença do parasito no local (DE SOUZA *et al.*,2002).

Alguns helmintos são comumente associados à anemia ferropriva como o *A. duodenale* e o *N. americanus* que quando na fase adulta utilizam sua cápsula bucal para se fixar à mucosa intestinal do parasitado onde se alimentam de sangue e com isso causam espoliação crônica e perda de sangue. Alguns fatores como idade, carga parasitária, associação com outros helmintos parasitas podem influir na intensidade da manifestação (DE SOUZA *et al.*,2002).

Existem três fatores de extrema importância para que ocorra a infecção por parasitas que são: o parasito, as condições do hospedeiro e o meio ambiente. Em relação ao agente parasitário podem ser citadas a resistência que ele possui ao sistema imune do hospedeiro e também os mecanismos de escape que são inerentes as transformações ocorridas ao longo do ciclo de vida de cada parasito. Os fatores que são inerentes ao hospedeiro são: idade, estado nutricional, genética e fatores relacionados a comportamento e profissão. A união das condições ambientais com os fatores descritos anteriormente vai favorecer e facilitar a propagação de doenças parasitárias (FREI *et al.*, 2008).

1.3. Helminthíases no mundo

Estimativas confirmam que cerca de 4,5 bilhões de pessoas no mundo estão susceptíveis a infecções por helmintos transmitidos pelo solo, entre esses encontram-se *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e os ancilostomídeos (HU *et al.*, 2013). Cerca de mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com um ou mais de um geo-helminto que promovem a infecção através dos seus ovos que são ingeridos por meio de alimentos e água contaminados (HU *et al.*,2013). As condições de higiene da população, o nível socioeconômico e grau de escolaridade e também a falta de saneamento básico vão contribuir diretamente para a transmissão de helmintos parasitas a população de determinada localidade (MACHADO *et al.*,1999)

Dados comprovam que na América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas estão abaixo da linha da pobreza. Além disso, cerca de 2,4 milhões de pessoas não possuem saneamento básico o que prejudica o acesso a essas pessoas a água segura e a promoção de higiene pessoal e um bilhão de pessoas não possuem água potável acessível. A nível escolar, cerca de um bilhão de adultos são analfabetos e 110 milhões de crianças estão fora das escolas por inúmeros motivos existentes (DE ANDRADE *et al.*,2010).

As parasitoses intestinais são classificadas como problemas de saúde pública e sua ocorrência tem maior destaque em países com baixo desenvolvimento socioeconômico e estas são tratadas na Atenção Primária (FERRAZ *et al.*,2014). As populações mais pobres apresentam maiores índices de prevalência de helmintíases intestinais e doenças como ascaridíase, tricuriase e infecções causadas por ancilostomídeos (ORSO *et al.*,2014). Cerca de 20 a 30% da população que habita as Américas estão infectadas por esses helmintos parasitas (DE ANDRADE *et al.*,2010).

1.4. Helmintíases no Brasil

As infecções causadas por helmintos parasitas é um grave problema enfrentado pela população brasileira e está relacionada às péssimas condições de saneamento básico e utilização de água contaminada. O alto custo das obras para oferecer o saneamento básico adequado à população é um fator muito relevante e dificulta a instalação da rede de esgoto. Outro fator que prejudica a promoção da saúde e combate a essas parasitoses é a falta de investimento em programas educacionais em localidades onde existe maior prevalência de helmintíases. É de grande importância a implantação de programas educacionais do Governo a fim de promover mudança de costumes e crenças que facilitam os mecanismos de transmissão de helmintíases (GIATTI *et al.*,2004)

Entretanto, em 2005 foi aprovado o Plano Nacional de Vigilância e Controle de Enteroparasitoses pelo Ministério da Saúde que visa estabelecer estratégias para o controle das parasitoses intestinais por meio de informações obtidas sobre prevalência, morbidade e mortalidade associada a infecções por

helmintos. Além destes objetivos o Plano visava conhecer os agentes etiológicos das parasitoses além de promover a normatização, coordenação e avaliação de ferramentas para a prevenção e controle, identificar os fatores de riscos e promover atividades educativas para orientar os profissionais de saúde (DE ANDRADE *et al.*,2010).

Os estudos epidemiológicos são bem escassos no Brasil e quando realizados se apresentam de forma fragmentada. Sendo assim, algumas localidades possuem esses estudos e outras não. A agregação de características regionais, sociais e econômicas é uma grande dificuldade para a realização de estudos epidemiológicos. A falta de dados é muito prejudicial para a implantação de estratégias preventivas e de tratamento, pois não é possível determinar de forma regional a gravidade das infecções causadas por parasitas intestinais e por fim traçar o perfil epidemiológico e verificar a distribuição dessas helmintíases (FERRAZ *et al.*,2014).

1.5. Tratamento das Helmintíases

As infecções por helmintos são problemas de saúde pública e de grande magnitude. O tratamento utilizado para as helmintíases visa agir atuando de forma local para expulsar ou provocar a morte dos helmintos parasitas que habitam o trato gastrointestinal, e outros atuam de forma sistêmica a fim de restabelecer a homeostase do organismo. Os mecanismos são diversos, envolvendo a paralisia do helminto, a geração de danos e descamação da cutícula, alterações no metabolismo do parasita, entre outros (MANKE *et al.*,2015). Os medicamentos mais utilizados no tratamento das helmintíases são os benzimidazóis, avermectinas, imidazóis e as salicilanilidas (MELO *et al.*,2015).

Os parasitas nematódeos transmitidos pelo solo, como *A. lumbricoides* e os ancilostomídeos que podem acometer de forma severa a população possui como tratamento de primeira linha os benzimidazóis que são agentes de amplo aspecto e os mais utilizados são o albendazol, mebendazol e o tiabendazol. Entretanto, o uso do tiabendazol é evitado devido a sua elevada toxicidade e seu uso promove efeitos como náuseas e vômitos (BRAZ *et al.*, 2015).

Os benzimidazóis atuam como agentes seletivos para a beta-tubulina dos nematódeos o que com faz com que ocorra uma ação seletiva do fármaco na proteína do parasito (BRAZ *et al.*, 2015). Estudos indicam que a ação desses medicamentos causa alterações ultraestruturais nas células intestinais dos nematoides e nas células tegumentares dos cestóides e assim ocorre uma desorganização de vesículas citoplasmáticas e outras organelas. Sendo assim, alterações como a desorganização do citoplasma e inibição do transporte mediado por microtúbulos são efeitos provenientes do uso dessa classe de fármacos nos helmintos (KÖHLER, 2001). Os microtúbulos são organelas de extrema importância, pois estão envolvidos em funções vitais inerentes ao organismo de todos os eucariontes, eles atuam na mitose, motilidade e transporte. Ao ocorrer a interação fármaco-tubulina ocorre uma mudança nos microtúbulos que resulta na perda da capacidade de polimerização e o acúmulo de tubulina livre nas células dos parasitos. A função dos microtúbulos é essencial para a sobrevivência celular e alterações nessas organelas podem levar a morte do organismo (KÖHLER, 2001).

Os esquemas terapêuticos para o tratamento de infecções causadas por esses helmintos vão diferir de acordo com a patologia em questão, que irá determinar o medicamento de escolha. Para o tratamento de adultos e crianças maiores de dois anos é utilizada dose única de 400 mg por via oral do albendazol ou então o mebendazol de 100 mg , via oral, duas vezes ao dia no período de três dias (BRAZ *et al.*,2015).

	Albendazol	Mebendazol	Ivermectina
Ancilostomídeos	++	++	-
<i>Trichuris</i>	++	+++	+
<i>Ascaris</i>	++	++	++
Estrongiloídes	++	+	++

Tabela 1 – Atividade dos antihelmínticos em alguns helmintos transmitidos pelo solo

Os agonistas nicotínicos são antihelmínticos bem usuais e possuem uma diferença da maioria dos antihelmínticos, pois não atua no sistema nervoso do parasita (KÖHLER, 2001). Os fármacos pertencentes à classe são os imidazoís, como o levamisol; as tetrahidropirimidinas, como pirantel, morantel e oxantel. Além deste pertencem a esta classe os sais quaternários de amônio e pirimidinas (MARTIN, 1997). O mecanismo de ação é baseado na paralisia espástica do músculo do helminto que pode levar a sua morte, isso ocorre porque a superfície muscular dos nematoides possui receptores nicotínicos que podem ser abertos por antihelmínticos nicotínicos e, ao fazer isso, esses fármacos desencadeiam uma despolarização que resulta na paralisia muscular do corpo do helminto (KÖHLER, 2001).

Outra classe comumente utilizada é das lactonas macrocíclicas, que compreendem compostos como as avermectinas (ivermectina e doramectina) e as milbemicinas (moxidectina). Os fármacos são bastante conhecidos por sua atividade contra nematoides, inseticida e ascaricida. Possuem como mecanismo de ação a produção de paralisia da musculatura somática do helminto, impedindo a alimentação do parasita através do bloqueio do movimento faringeal (KÖHLER, 2001). No tratamento de estrogiloidíase, estudos comprovaram que a ivermectina promove maior mortalidade de larvas do *Strongyloides stercoralis* em comparação ao albendazol, sendo assim a ivermectina é o fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha, pois possui menor toxicidade que o tiabendazol e maior eficácia que o albendazol (BRAZ *et al.*,2015).

O praziquantel é um medicamento antihelmíntico de escolha utilizado para o tratamento de esquistossomose (HALTON, 2004). O mecanismo de ação não foi completamente elucidado, mas o fármaco produz efeitos no tegumento do parasita e interfere na contração muscular causando paralisia espástica (VIGNADUZZO *et al.*,2015). Estudos sugerem que o sitio de ação do praziquantel são os canais de cálcio, devido à alteração do influxo de cálcio provocado pelo fármaco (KÖHLER, 2001).

O uso de produtos naturais como pontos de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos foi de grande utilidade para as indústrias farmacêuticas. O uso de metabólitos secundários de plantas como

fonte de princípios ativos para novos medicamentos ocorre desde o século XIX (MONTANARI, 2001). Dados da OMS informam que cerca de 80% da população mundial faz uso de alguma planta para fins terapêuticos no tratamento de helmintíases. Diversas plantas têm sido investigadas devido a seu potencial antihelmíntico entre elas estão *Aerva lanata*, *Cassia auriculata*, *Citrus medica* entre outras espécies de plantas (MANKE *et al.*,2015).

1.6. *Laurencia dendroidea*

As algas do gênero *Laurencia*, da família Rhodomelaceae, ordem Ceramiales, são características de regiões de clima tropical, subtropical e regiões de clima temperado quente e são conhecidas pela produção de diversos metabólitos secundários que geralmente possuem átomos de halogênio em sua composição (SUDATTI *et al.*,2011.LHULLIER *et al.*,2009).

O gênero *Laurencia* possui mais de 700 compostos halogenados relatados. Com isso, essas algas tornaram-se potenciais alvos de pesquisa para novos fármacos. Diversas substâncias químicas têm sido estudadas como possíveis alvos para pesquisas farmacológicas. Dentre esses compostos químicos estão sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e acetogeninas principalmente halogenados (MACHADO *et al.*,2014). Algumas atividades das algas do gênero *Laurencia* foram comprovadas, como atividade antibacteriana, antiviral, citotóxica, leishmanicida e anti-inflamatória (MACHADO *et al.*,2014)

O perfil químico de algas da espécie *Laurencia dendroidea* na costa sudeste do Brasil foi demonstrado por Machado *et al.* (2014). As algas foram coletadas no Rio de Janeiro nas localidades de Angra dos Reis e Parati, e no Espírito Santo na localidade da Serra. De cada alga coletada dessas três localidades foram obtidos os metabólitos majoritários. Nas algas da região de Angra dos Reis foi encontrado como majoritário a dendroidona, nas algas do Espírito Santo foi isolado o dendroidiol e por fim nas algas de Parati foi isolado o metabólito majoritário, debromoelato (MACHADO *et al.*,2014).

1.7. Elatol

O Elatol é um metabólito secundário que foi isolado pela primeira vez em uma alga da espécie *Laurencia elata* e a partir dessa descoberta o elatol foi isolado de outras espécies de *Laurencia sp.* Dentre suas funções como metabólito secundário, ele possui potencial de defesa contra infecções causadas por microorganismos e também inibe atividade herbívora (DOS SANTOS *et al.*,2010).

O uso do elatol em protozoários como a *Leishmania amazonensis* mostrou-se bem eficaz na morte da forma promastigota do protozoário. Estudos demonstram que a exposição ao elatol causa diversas lesões ultraestruturais e diminui significativamente a sobrevivência da forma promastigota do *L. amazonenses* (DOS SANTOS *et al.*, 2010). Neste estudo nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 μ M elatol diminuiu a sobrevivência dos promastigotas de *L. amazonenses in vitro* (DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Além de protozoários do gênero *Leishmania*, os efeitos do elatol também já foram demonstrados em *Trypanosoma cruzi* (Veiga-Santos *et al.*, 2010). Neste protozoário, elatol foi capaz de causar danos morfológicos e ultraestruturais, como inchaço nas mitocôndrias e formação de grandes vacúolos citoplasmáticos e essas alterações foram vistas nas formas epimastigota e tripomastigota. O elatol foi comparado a um medicamento usual, o benzonidazol e apresentou melhor atividade contra as formas amastigota e tripomastigota do *T.cruzi* (Veiga-Santos *et al.*, 2010).

Além disso, estudos realizados por Davyt *et al.* (2001) apontam que a espécie *Laurencia scorparia* obtida na Praia Brava no RJ possui atividade antihelmíntica em *Nippostrongylus brasiliensis* (DAVYT *et al.*,2001)

1.8. *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é classificado como um nematoide de vida livre e que se encontra principalmente na água do solo e comumente encontrado em clima temperado. Possui um ciclo de vida curto e simples que dura em torno de 3 a 4 dias, seu tamanho é pequeno por volta de 1 mm e se

mantém em temperaturas entre 22°C – 25°C (JHIANG, *et al.*; 2016). Devido a estas características o *C.elegans* tornou-se um modelo experimental para o desenvolvimento de pesquisas diversas nas áreas biológicas e pesquisas com o objetivo de avaliar a possível atividade anti-helmíntica de substâncias ou compostos. O *C.elegans* possui baixo custo de manutenção, ciclo de vida simples e rápido, possui reprodução fácil e as culturas são fáceis de manipular. Sendo assim, a utilização do modelo experimental para realização de ensaios a fim de investigar o comportamento, sobrevivência e outras características de nematoides é viável (SANT'ANNA *et al.*,2013)..

O genoma do *C.elegans* é totalmente conhecido e já sequenciado e com isso esse nematoide de vida livre é também um ótimo modelo experimental para ensaios toxicológicos (JHIANG *et al.*, 2016). Estudos relatam a utilização do *C.elegans* como modelo experimental bem eficaz para testar *in vitro* os medicamentos antihelmínticos disponíveis no mercado (KATIKI *et al.*,2011).

O *C.elegans* possui um ciclo de vida bem rápido e simples e possui quatro estágios de larva até a fase adulta. O desenvolvimento do *C.elegans* da forma de ovo para eclodir como L-1 dura cerca de 9 horas e para o próximo estágio de L-2 são precisas mais 12 horas. Já em L-2 o *C.elegans* para o estágio de L-3 e L-4 são necessárias mais 8 horas para cada estágio. No ultimo estágio o helminto leva 18 horas para entrar na fase adulta.

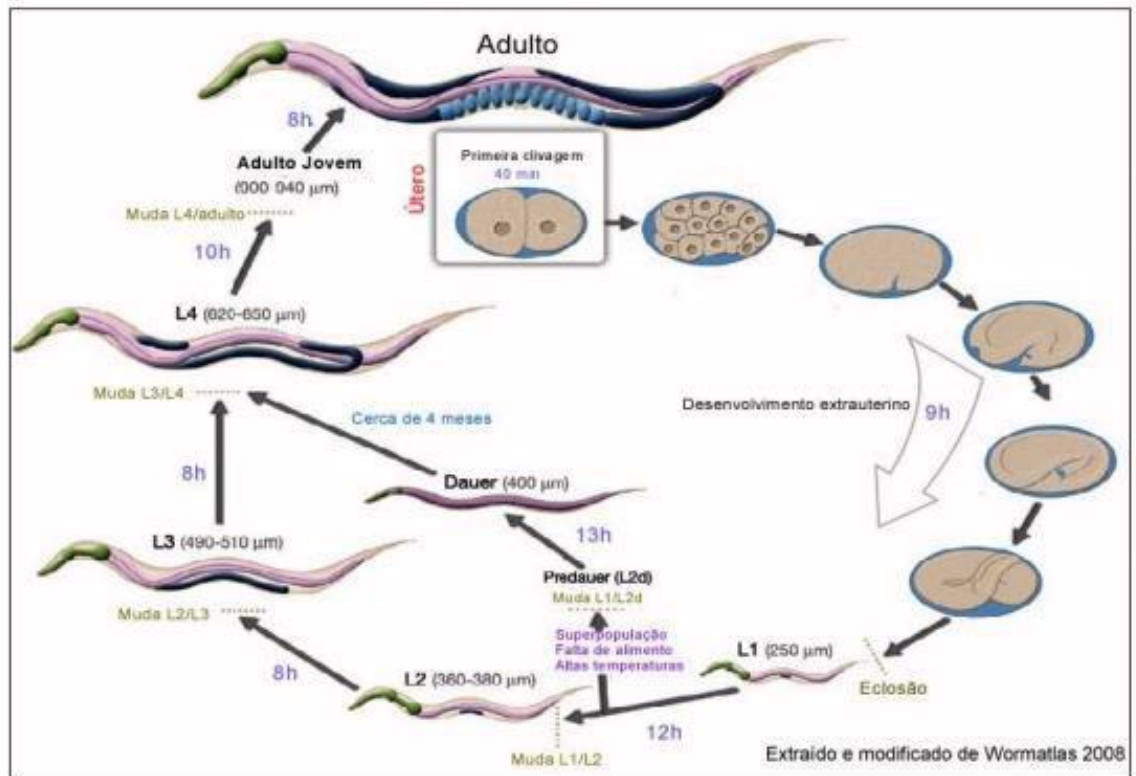


Figura 5 - Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. As setas indicam o tempo decorrente de cada etapa de desenvolvimento do helminto.

2. Justificativa

As helmintíases são graves problemas de saúde pública no Brasil e em todo mundo. Por acometerem em sua grande maioria a população de localidades com baixo nível socioeconômico, helmintíases, como filariose, esquistossomose, Ascariase, Tricuríase, Necatoríase e Ancilostomíase, são consideradas doenças negligenciadas e que do ponto de vista financeiro não apresentam atrativos para agências de fomento e grandes empresas farmacêuticas.

Diversos fatores provocam o surgimento dessas infecções causadas por helmintos, como o uso de água de má qualidade, falta de hábitos de higiene, grau de escolaridade, saneamento básico inexistente ou precário. Em localidades em que bons hábitos de higiene não são difundidos é bem comum a ocorrência de helmintíases (MANKE *et al.*, 2015).

Segundo a OMS, o Brasil possui cerca de nove doenças negligenciadas que são endêmicas no território nacional. Entre elas estão as geohelmintíases causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Trichuris trichiura*. O controle e prevenção dessas helmintíases intestinais são de grande importância para a qualidade de vida da população local, além de promover a redução da pobreza da população (AGUIAR-SANTOS *et al.*, 2013).

O arsenal terapêutico utilizado para o tratamento de helmintíases é composto por algumas classes de medicamentos como os benzimidazóis, agonistas nicotínicos, lactonas macrocíclicas, praziquantel entre outros medicamentos. Este arsenal terapêutico é bastante restrito e o uso indiscriminado desses medicamentos vem provocando a resistência por parte dos helmintos a eles. Sendo assim, o esquema terapêutico utilizado para o tratamento de helmintíases está desatualizado e em alguns casos não possui mais o efeito desejado (KOHLENER, 2001).

A resistência aos antihelmínticos usuais despertou necessidade de novos medicamentos que sejam eficazes para o tratamento de helmintíases. Sendo assim, são necessários novos estudos para o desenvolvimento de novos princípios ativos com potencial anti-helmínticos. Os produtos naturais são alternativas promissoras para o desenvolvimento de substâncias com potencial anti-helmíntico e diversos estudos vem sendo realizados para comprovar a possível atividade anti-helmíntica de produtos naturais (MANKE *et al.*, 2015).

Neste contexto, a busca de novos compostos antihelmínticos se faz necessária e os produtos naturais encontrados nas macroalgas da região de Macaé-RJ são promissores. Mesmo possuindo atividade anti-*Leishmania* (da Silva Machado *et al.*, 2011) e anti-*Trypanosoma* (Veiga-Santos *et al.*, 2010), a atividade anti-helmíntica do extrato de *Laurencia dendroidea* ainda não foi avaliada. Por isso, seu efeito anti-helmíntico será avaliado no modelo experimental *C. elegans*.

3. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antihelmintico do extrato bruto e do metabólito elatol obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito de extrato bruto de *Laurencia dendroidea* em diferentes concentrações na sobrevivência de helmintos adultos de *Caenorhabditis elegans*;

Avaliar o efeito do metabólito Elatol extraído da alga *Laurencia dendroidea* em diferentes concentrações na sobrevivência de helmintos adultos de *Caenorhabditis elegans*;

Investigar alterações morfológicas e estruturais promovidas pelo extrato bruto de *Laurencia dendroidea* e pelo elatol em helmintos adultos de *Caenorhabditis elegans* através da microscopia óptica.

4. Metodologia

4.1. Cultivo e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para o cultivo do *C. elegans*, a bactéria *Escherichia coli* (CP50) foi utilizada como fonte alimentar para o *C. elegans* e mantida em meio L-Broth (5g de Triptona, 2,5 g de Extrato de levedura, 2,5g de NaCl, 7,5g de Ágar e 500ml de água destilada). A cepa N2 de *C. elegans* foi mantida em placas de cultivo contendo meio NG (3g/L de NaCl; 17 g/L de ágar; 2,5 g/L de peptona; 1 mM CaCl₂; 5 mg/L de colesterol em etanol; 1 mM MgSO₄ e 25 mM KPO₄) e com a bactéria a 22°C. Foram feitos repiques a cada 7 dias para garantir a sobrevivência dos helmintos. A cultura foi mantida segundo Brenner (1974).

4.2. Avaliação da atividade do extrato bruto de *Laurencia dendroidea* em formas adultas de *Caenorhabditis elegans*

As análises foram realizadas com o extrato da alga *Laurencia dendroidea* e seu metabólito Elatol. O extrato e o elatol foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dra. Angélica Ribeiro Soares (Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA), NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Macaé-RJ). O extrato foi obtido por meio de uma extração ácido-base do extrato bruto em CH₂Cl₂ e as suas frações foram obtidas a partir do extrato.

Para a realização dos experimentos foi necessário realizar a sincronização da cultura para a obtenção dos ovos de *C. elegans*. Inicialmente a placa de cultivo foi lavada com água destilada ou meio M9 (3 g de KH₂PO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 5 g de NaCl, 1 ml de MgSO₄ 1 M e 1L de H₂O) para a coleta dos helmintos da placa, em seguida foi adicionada uma solução constituída de 0,5 ml de NaOH 5M e 1ml de hipoclorito 6% para que ocorresse a destruição dos adultos e larvas mantendo-se apenas os ovos preservados. O DMSO 0,1% é utilizado pois ele é o solvente do extrato da *L. dendroidea*.

O lavado com a solução foi centrifugado a 3000g por 60 segundos para que houvesse a sedimentação dos ovos. Após a centrifugação foram realizadas lavagens repetidas em meio M9 para retirada dos resquícios da solução e por fim os ovos colocados em uma placa de cultivo. Três dias após a lavagem, os *C. elegans* adultos foram obtidos e cerca de 30 helmintos foram

incubados em uma placa de 96 poços contendo meio S.medium [meio S.basal (5,85 g de NaCl, 1 g de K₂ HPO₄, 6 g de KH₂PO₄, 5mg/ml de colesterol em etanol e 1L de H₂O), 10 mL de citrato de potássio 1 M, pH 6,0, 3 ml de CaCl₂ a 1 M, 3 ml de MgSO₄] durante 3 dias com a adição do extrato de *Laurencia dendroidea* ou elatol a temperatura de 22°C. A bactéria *E.coli* foi adicionada ao meio de incubação como fonte alimentar. Tanto o extrato quanto o elatol foram utilizados nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 200 e 400 ng/mL. A leitura dos resultados é realizada em microscópio invertido onde são contados os helmintos vivos e os mortos. A avaliação de sobrevivência é feita por meio da verificação da motilidade e movimento bulbo-faríngeo.

O percentual de sobrevivência foi plotado em função da concentração dos compostos utilizando-se uma análise não-linear com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (One-way ANOVA, Newman-Keuls pós teste) e a significância aceita se $p < 0,05$.

4.3. Análise morfológica do efeito do extrato de *L. dendroidea* e elatol em *C.elegans* adulto por microscopia de Luz.

Os helmintos foram fixados em AFA (ácido acético glacial, formol 37% e álcool etílico 70%), depois lavados em tampão cacodilato e transferidos com uma micropipeta para lâminas de vidro e cobertos com uma lamínula para serem observados ao microscópio Olympus BX51 equipado a câmera Olympus DP71.

5. Resultados

5.1. Efeito do extrato FOR em *C.elegans* adultos

O efeito do extrato FOR foi avaliado e plotado em uma curva que demonstrou o percentual de sobrevivência de helmintos adultos de acordo com o aumento da concentração do extrato deste extrato, conforme mostrado no gráfico 1. O percentual de sobrevivência do grupo controle e DMSO 0,1% estão bem próximos ao 100%.

Apesar da diminuição da sobrevivência observada nas concentrações de FOR 200 e 400 mg/mL, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações testadas.

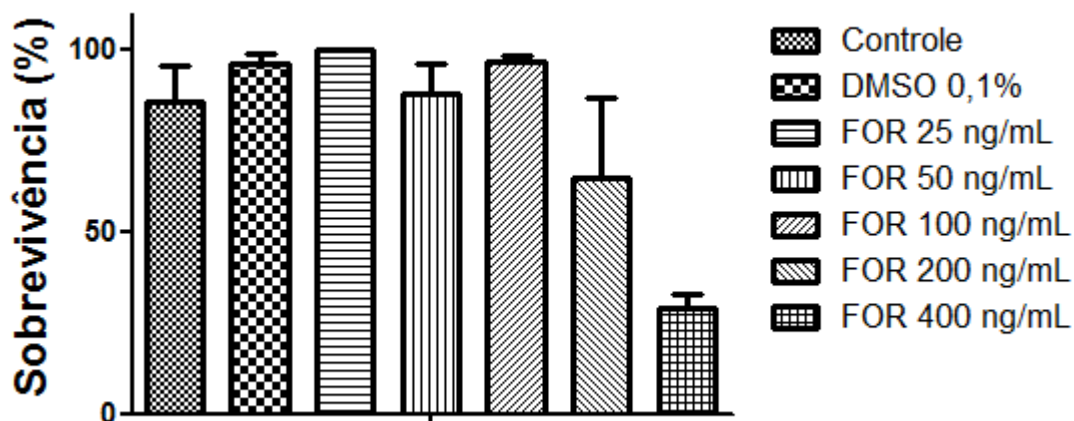


Gráfico 6 - Percentual de sobrevivência de formas adultas de *C. elegans* após tratamento com o extrato FOR de *Laurencia dendroidea*. Resultado de 3 dias de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três a cinco experimentos em triplicata. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados ($P > 0,05$; One-way ANOVA, Newman-Keuls pós-teste).

5.2. Efeitos do elatol na sobrevivência de *C. elegans* adulto

O efeito do elatol foi avaliado e plotado em uma curva que demonstrou o percentual de sobrevivência de helmintos adultos de acordo com o aumento da concentração do metabólito elatol, conforme mostrado no gráfico 2. O percentual de sobrevivência do grupo controle e DMSO 0,1% estão bem próximos ao 100%.

O tratamento dos helmintos adultos com elatol mostrou significativas alterações na sobrevivência desde as primeiras concentrações. Foram observadas diminuições estatisticamente significativas da sobrevivência dos *C. elegans* adultos nas concentrações de 50, 100 e 400 ng/mL. Com o aumento das concentrações do elatol houve um aumento na mortalidade dos helmintos testados. Sendo assim, o elatol foi eficaz na redução da sobrevivência dos *C. elegans* adultos.

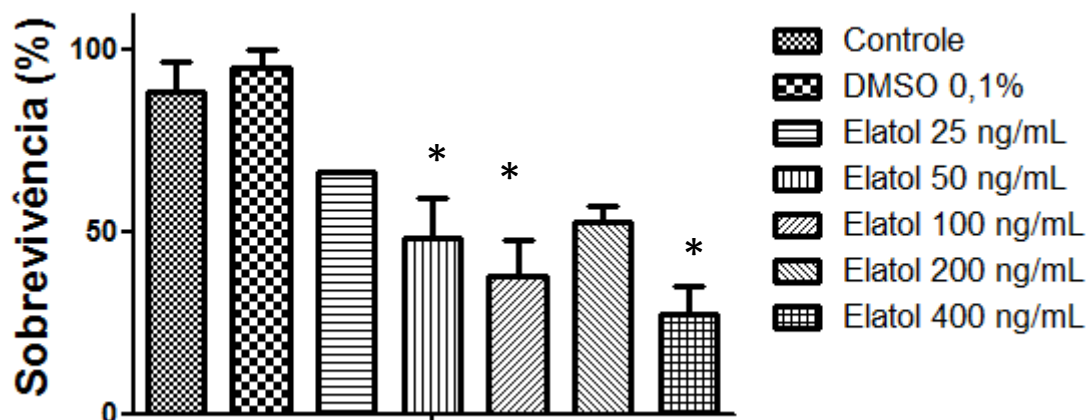


Gráfico 7 - Percentual de sobrevivência de formas adultas de *C. elegans* após tratamento com o metabólito elatol de *Laurencia dendroidea*. Resultado de 3 dias de incubação em diferentes concentrações. Os valores são a média \pm e Erro Padrão da Média (EPM) de três a cinco experimentos em triplicata. O asterisco significa diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados e o controle ($P < 0,05$; One-way ANOVA, Newman-Keuls pós-teste).

5.3. Efeitos do FOR e elatol na morfologia dos *C.elegans*

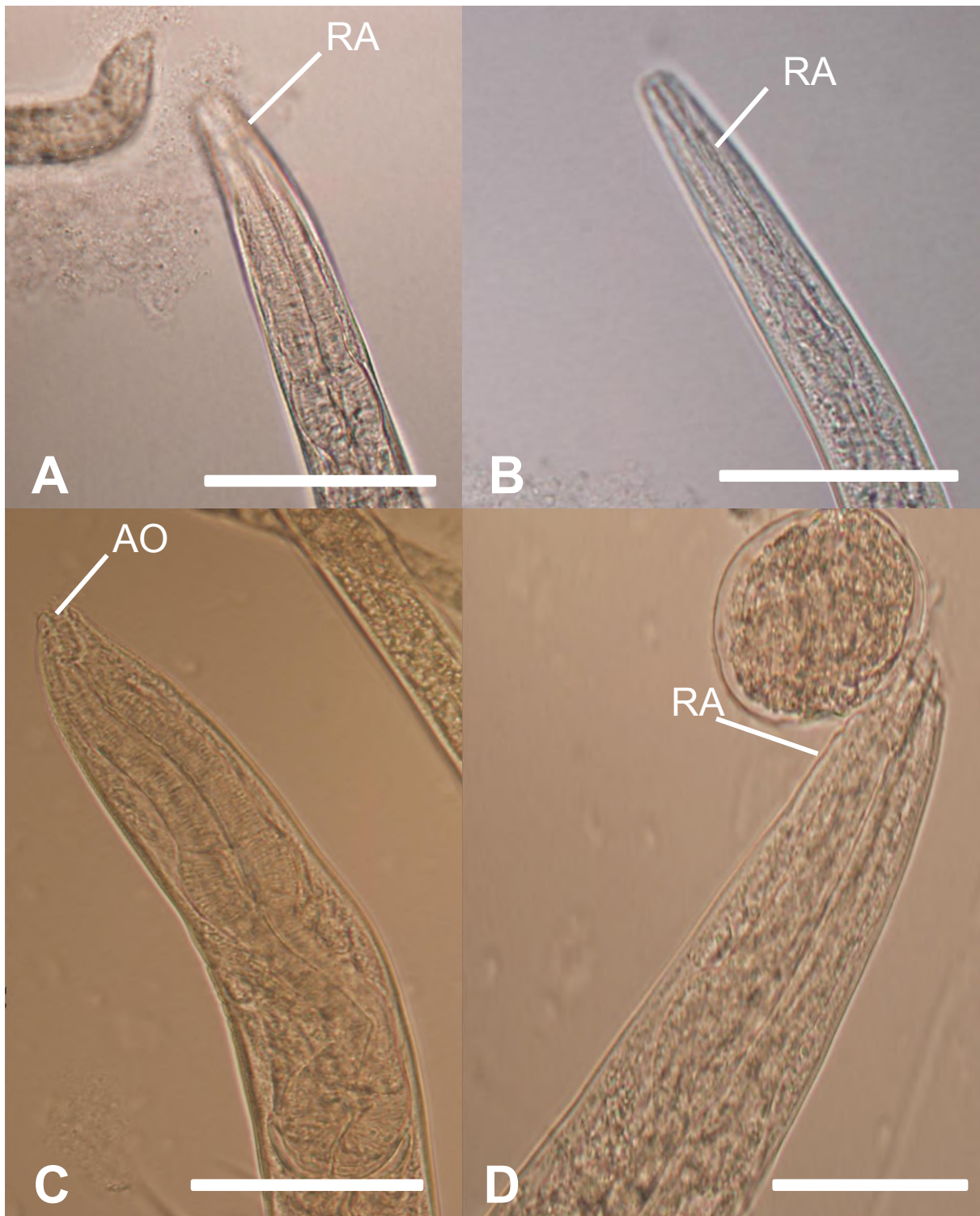
Os helmintos controle foram analisados por microscopia ótica e se apresentaram em sua forma intacta, com a extremidade anterior e abertura oral com morfologia normal e a porção posterior sem nenhuma alteração (Figura 4A e 4B). Nenhuma alteração foi observada nos *C. elegans* expostos ao DMSO 0,1% (Figura 4C e 4D)

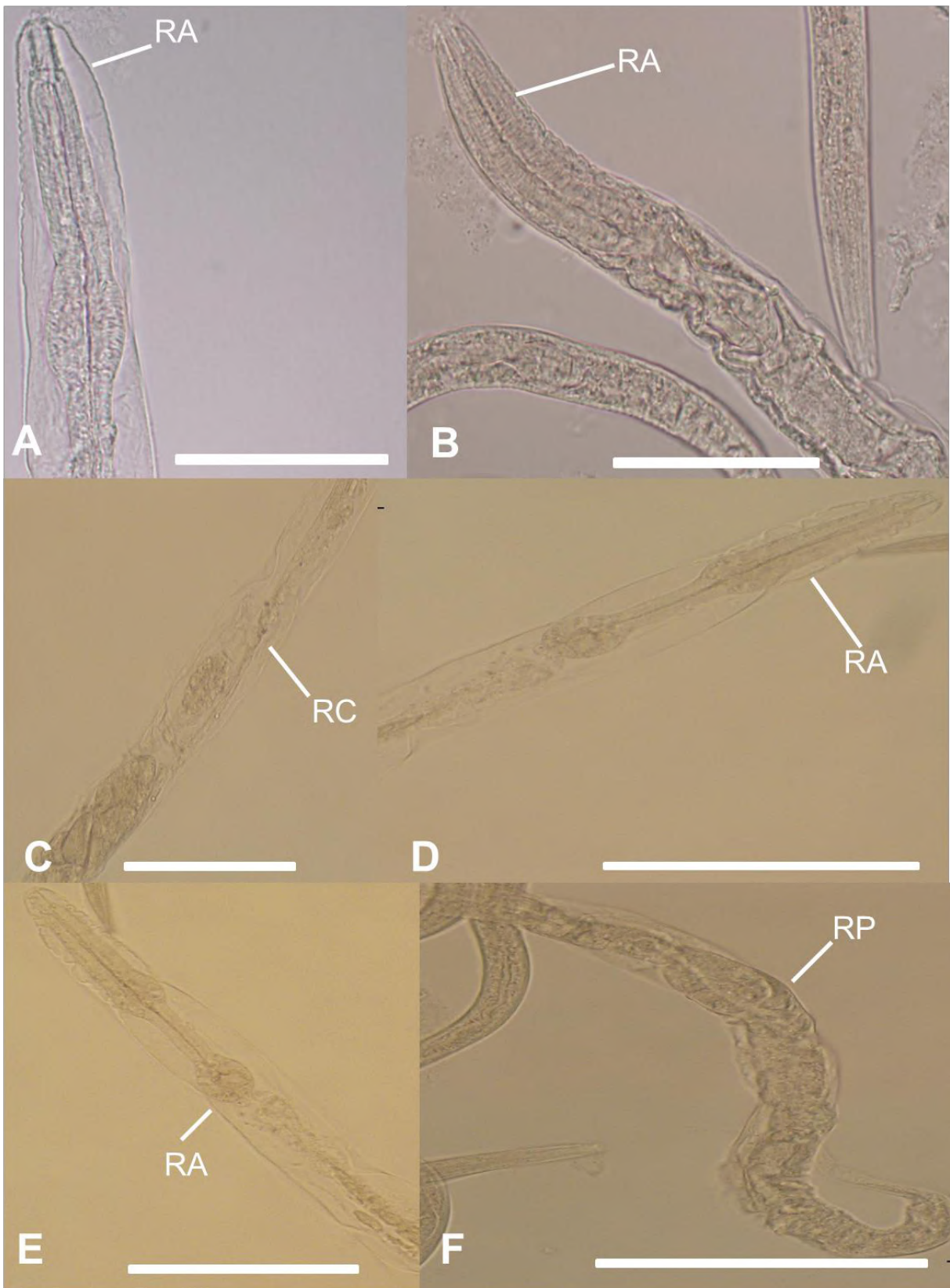
Por meio da microscopia ótica é possível observar a morfologia inalterada de *C.elegans* nos adultos que não foram tratados com o extrato ou elatol (Figura 4B). É possível observar a abertura oral e o aparelho bulbo-faríngeo (FIGURA 4B). Além disso, a porção posterior também foi analisada e está inalterada com a presença do aparelho reprodutor e a presença dos ovos.

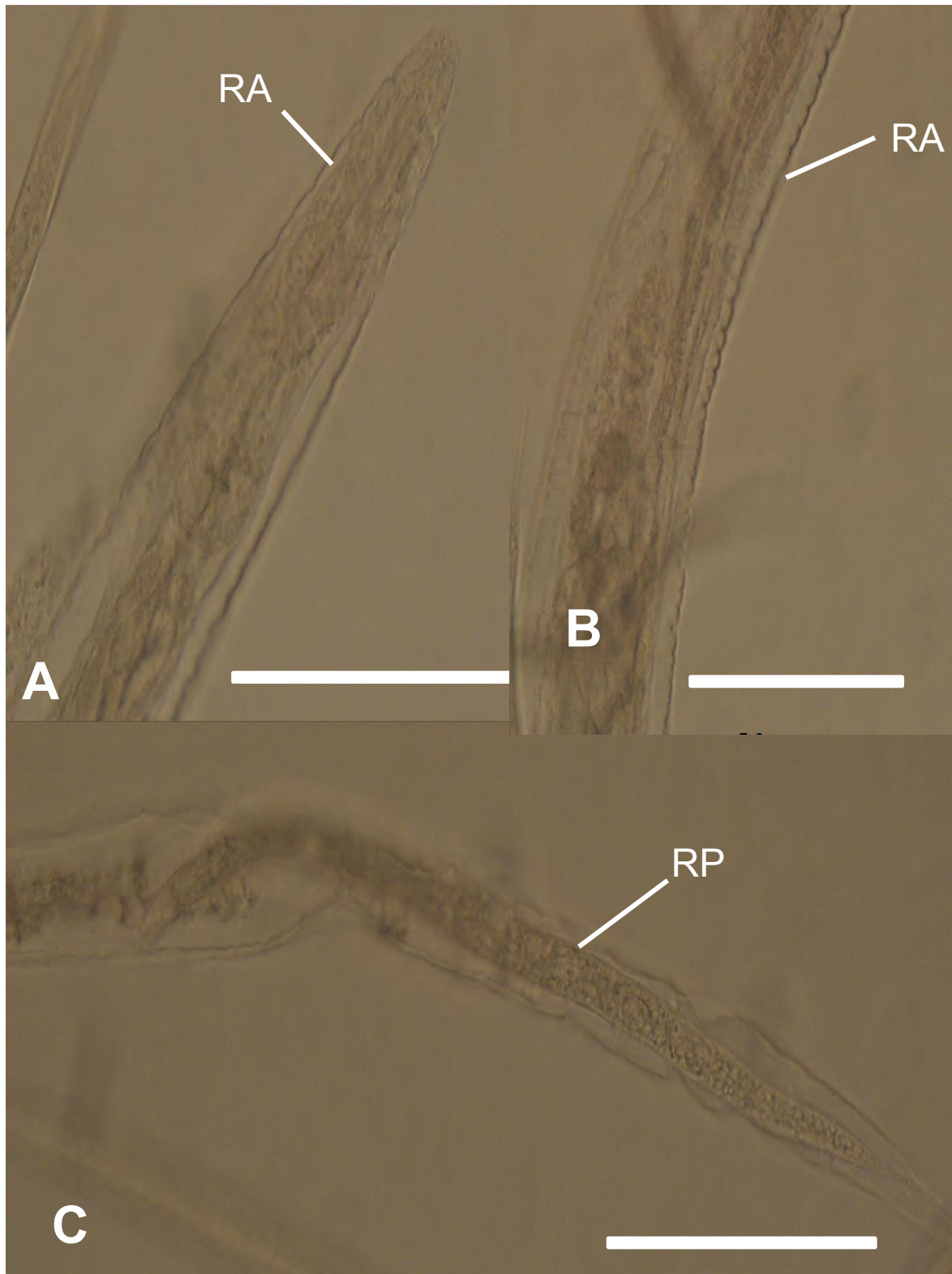
Nos ensaios realizados com o extrato FOR da *Laurencia dendroidea*, foram analisadas alterações estruturais nos *C. elegans* adultos e foi visível desde a primeira concentração do extrato (25 ng/ml), em que ocorreram deformações cuticulares ao longo do corpo do helminto (Figura 5A).

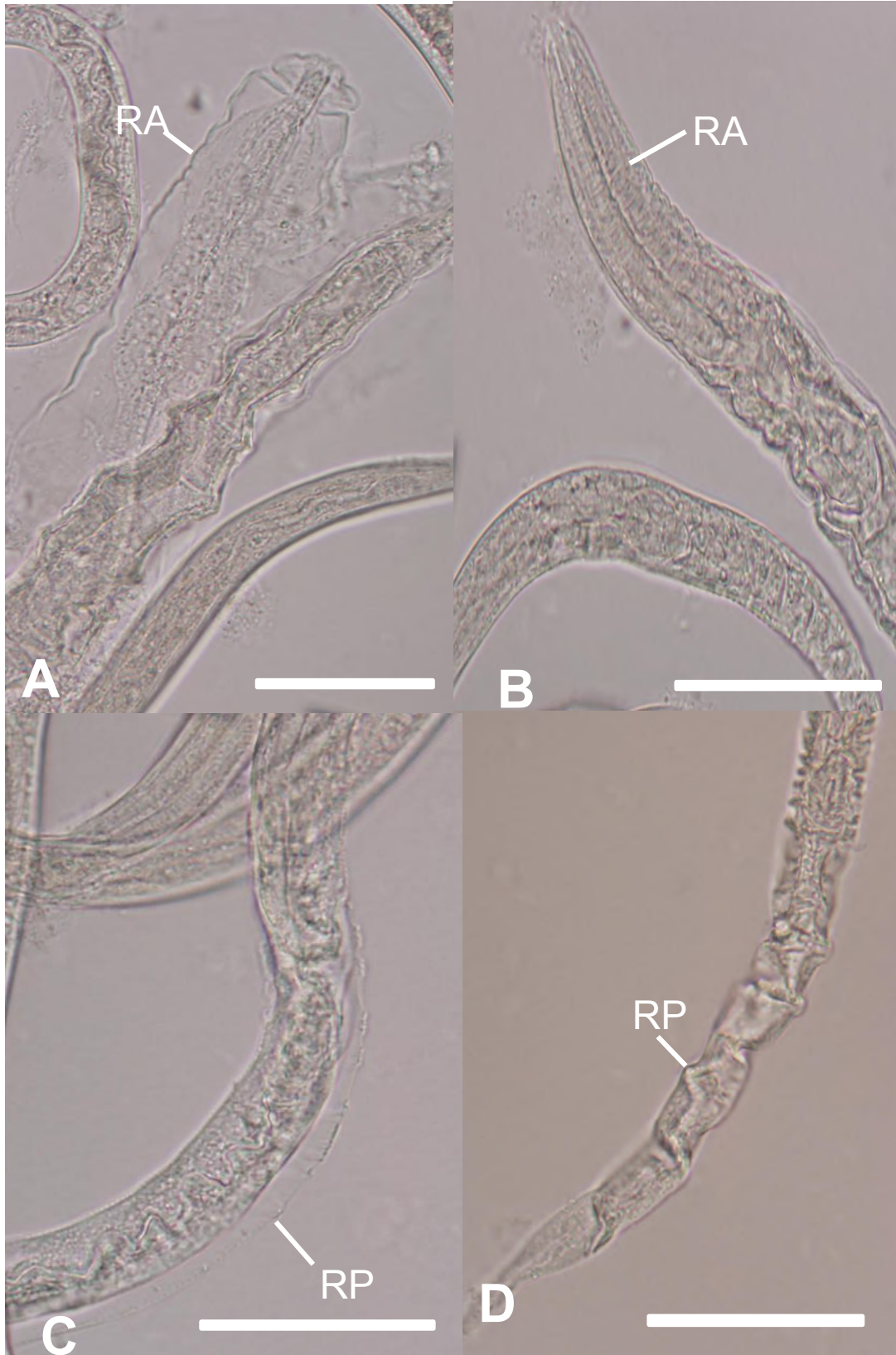
Além das alterações cuticulares, observou-se um pregueamento cuticular em helmintos expostos ao extrato FOR 25 ng/ml (Figura 5B). Na concentração de 50 ng/ml, o pregueamento cuticular é mais pronunciado e observa-se um processo de dano tecidual intenso principalmente na região anterior. Foram observados danos severos nos helmintos expostos ao FOR 100 ng/ml onde a porção posterior dos helmintos apresentou importantes deformações (Figura 6C).

Por meio das imagens de MO, foi possível observar os danos causados pela exposição do FOR 200 ng/ml, que se intensificaram com o aumento da concentração do extrato FOR, ocorrendo deformação na superfície cuticular com a formação de regiões pregueadas e alguns helmintos apresentaram descamação da cutícula (Figura 7A e 7C). A cutícula foi a camada em que mais alterações foram verificadas como pregueamentos e deformações. Algumas regiões do corpo apresentaram lesões nos órgãos internos. Sendo assim, o extrato FOR interfere na sobrevivência do modelo experimental *C.elegans* causando danos em sua estrutura que podem levar a sua morte.

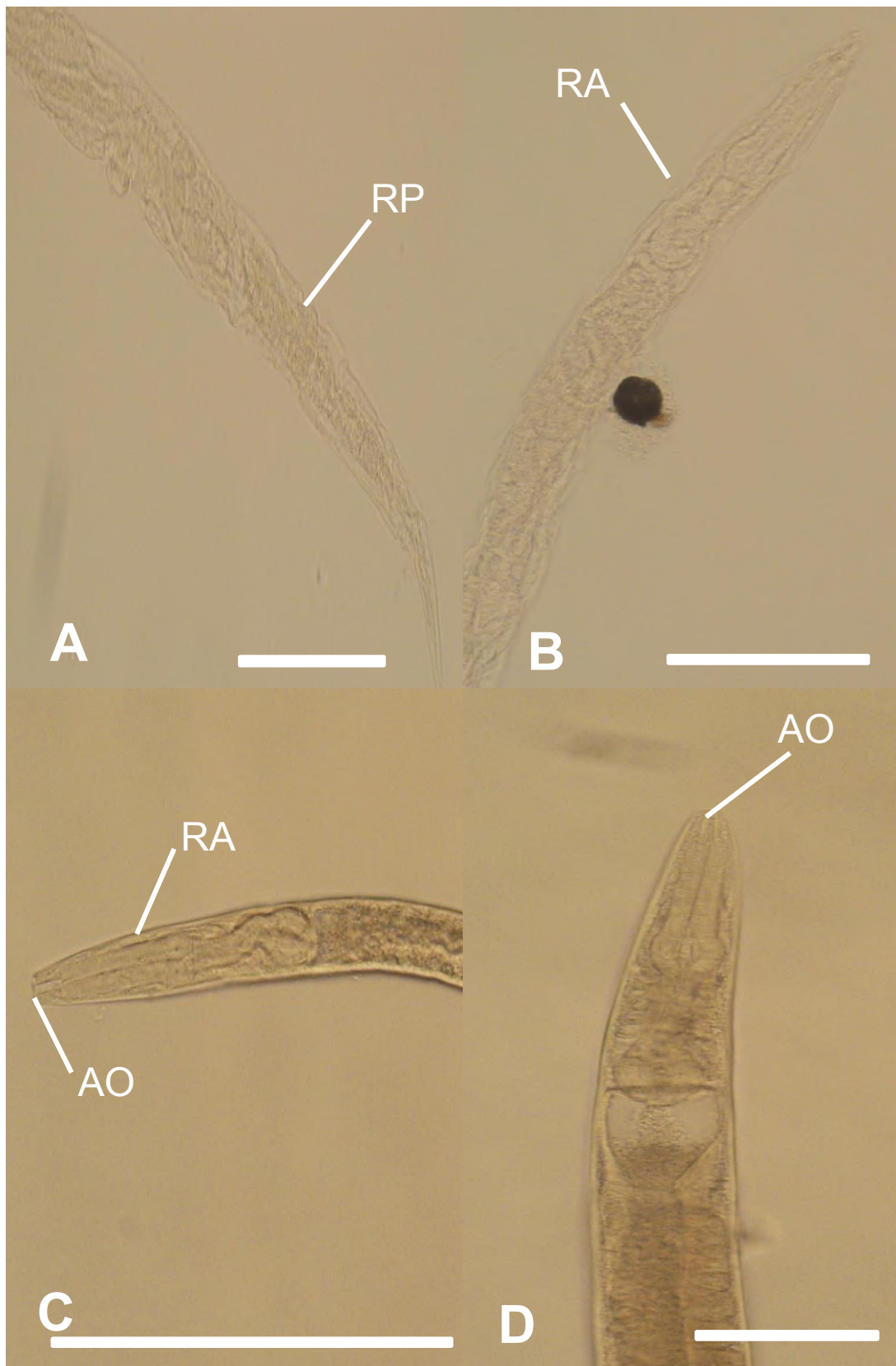


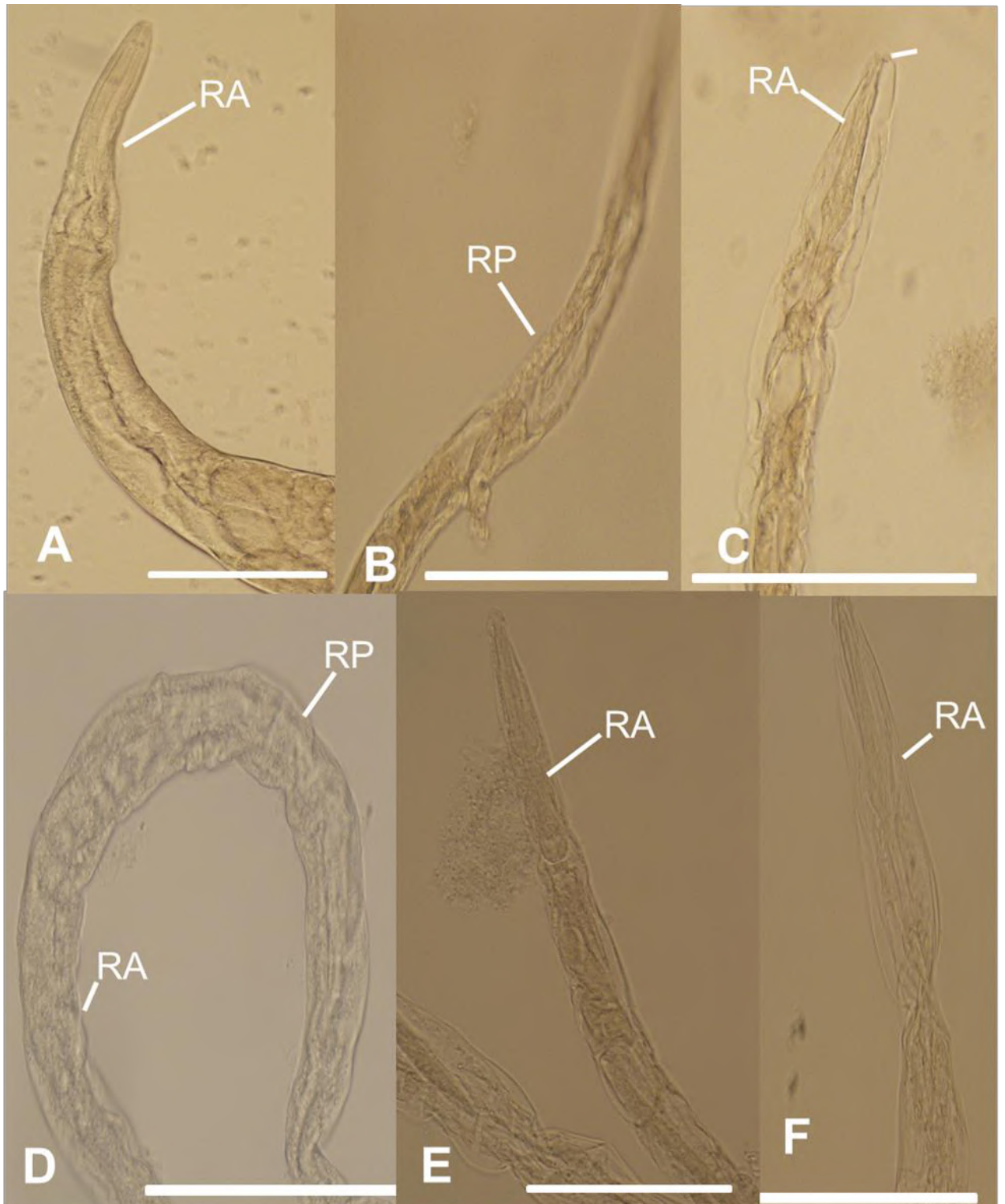






Nas micrografias obtidas dos helmintos tratados com elatol em diversas concentrações foram observadas diversas alterações estruturais. Nas imagens dos helmintos tratados com elatol 25 ng/ml é importante destacar a desorganização do corpo do helminto e também as deformações na cutícula com a formação de regiões pregueadas (Figura 8A e 8B). Porém, os *C.elegans* tratados com elatol 50ng/ml não apresentaram alterações tão proeminentes (Figura 8C e 8D). As concentrações de elatol de 100 e 200 ng/ml foram as que causaram maiores alterações. Nos helmintos tratados com o elatol 100 ng/ml foram visualizadas deformações ao longo do corpo do helminto como algumas regiões mais disformes, desorganização do corpo do helminto, e em algumas partes rupturas no corpo e cutícula do *C.elegans* o que pode levar ao extravasamento de estruturas internas. Além disso, também foram vistas alterações na cutícula que parece se desprender do corpo (Figura 9A, 9B e 9D). Com isso, o uso do elatol promoveu alterações estruturais que podem estar relacionadas com a morte dos *C.elegans*.





6. Discussão

O uso indiscriminado de medicamentos antihelmínticos desencadeia o processo de resistência a fármacos por parte dos helmintos, são inúmeros fatores que contribuem para a resistência como o uso abusivo, superdosagem, entre outros fatores. A resistência a fármacos antihelmínticos é devido a perda de sensibilidade genética de determinada espécie de helminto que é transmitida a populações que foram previamente sensíveis ao fármaco (KÖHLER, 2001).

Devido à resistência por parte de determinadas espécies de helmintos é necessária a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com potencial antihelmíntico. O arsenal terapêutico utilizado para o tratamento de helmintíases é bem antigo e em alguns casos sua eficácia é reduzida. Ensaios clínicos realizados concluíram que em pacientes poliparasitados a taxa de cura observada para os medicamentos convencionais, como albendazol e mebendazol, foi cerca de 38,7%, sendo assim, a efetividade do tratamento para poliparasitismo é bem baixa (BRAZ *et al.*,2015).

Diversas espécies de nematoides podem desenvolver resistência e pode ser resistente a um determinado medicamento antihelmíntico ou então uma espécie de nematoide pode não ser sensível a diferentes antihelmínticos. Contudo, o numero de helmintos que são resistentes é pequeno, porém a seleção a um determinado fármaco promove o aumento da resistência em organismos de uma determinada população (KLAUCK *et al.*,2014)

Com isso, o uso de produtos naturais como novas opções terapêuticas é uma ótima estratégia para melhorar o esquema terapêutico no tratamento de helmintíases. Sendo assim, o uso de produtos naturais e metabólitos em testes *in vitro* em modelos experimentais, como o *C.elegans*, podem ser de grande importância para a atualização do arsenal terapêutico antihelmíntico.

O resultado de sobrevivência obtido nos ensaios realizados com o extrato FOR, indicam que não ocorreram alterações significativas na sobrevivência dos helmintos adultos em relação ao controle. Entretanto, em FOR 400 ng/ml houve maior mortalidade em relação ao controle e outras concentrações do extrato. Apesar dos resultados obtidos em relação a sobrevivência, foram observadas diversas alterações morfológicas e estruturais

nos helmintos tratados com o extrato FOR em todas as concentrações testadas. Com isso, é demonstrada a possível atividade antihelmíntica do extrato FOR obtido das algas vermelhas *Laurencia dendroidea*.

O metabólito majoritário do extrato FOR, o elatol apresentou resultados importantes na sobrevivência dos *C.elegans* adulto. Nas concentrações de elatol 50, 100 e 400 ng/mL foi observada uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle. Sendo assim, o elatol promove o aumento da mortalidade dos helmintos testados. Portanto, o elatol possui potencial para comprometer a sobrevivência dos *C.elegans* adultos, o que é confirmado pelas imagens de alterações morfológicas causadas pelo elatol obtidas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.

O solvente utilizado para a diluição do extrato FOR e do elatol foi o dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração utilizada nos experimentos foi de 0,1% e sendo que os helmintos podem tolerar até 2% de DMSO sem que sua mobilidade e sobrevivência sejam comprometidas (KATIKI *et al.*,2011). Com isso, o uso de DMSO não comprometeu os resultados obtidos nos ensaios realizados.

Os nematoides, parasitos ou não, são helmintos delimitados por uma parede do corpo composta por uma cutícula, hipoderme e camada muscular. A cutícula é composta por colágenos e proteínas. Essa estrutura é diferenciada de acordo com o gênero e pode se apresentar de forma simples ou complexa. Além disso, a camada mais externa da cutícula é chamada de epicutícula, sendo conhecida como membrana dos nematoides, e é a verdadeira interface entre o helminto ou o ambiente, no caso de espécies de vida livre. (HALTON, 2004).

Em nematoides de vida livre como o *C.elegans* ocorre a liberação de substancias secretadas com fins de revestimento de superfície e, além disso, fornece lubrificação e proteção contra a abrasão, desidratação e predação (HALTON,2004). Sendo assim, essas substâncias secretadas pelos nematoides vão conferir a cutícula extrema importante para a sobrevivência do helminto, pois a cutícula desempenha diversas funções no equilíbrio de funções vitais dos nematoides. Com isso, lesões na região da cutícula dos nematoides podem causar sérios danos, que provocam a morte do helminto.

Os efeitos do elatol nos *C.elegans* adultos se concentraram principalmente na região cuticular dos helmintos, sendo a cutícula um órgão de extrema importância para a vida do nematoide, essas alterações provocadas pelo elatol, como formação de zonas pregueadas, ruptura na cutícula, descolamento da cutícula entre outros danos, podem ter culminado com a morte dos helmintos expostos ao metabólito elatol.

Alguns medicamentos antihelmínticos usuais promovem danos estruturais nos helmintos parasitas ou não, como as alterações cuticulares que promovem a morte dos nematoides. Estudos com o albendazol em *C.elegans* demonstraram que os nematoides expostos ao medicamento sofreram danos graves no corpo e descamação da cutícula. Os ovos de *C. elegans* tratados apresentaram aspecto granuloso e massa desorganizada de células. E além destas alterações as larvas L1-L2 apresentaram desorganização interna dos órgãos como foi observado nos resultados obtidos com o FOR e elatol em diversas concentrações (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

A utilização de medicamentos antihelmínticos que afetam a morfologia dos helmintos parasitas é bem usual e eficiente. Pois, a cutícula é um órgão de grande importância para a sobrevivência dos helmintos.

Apenas um trabalho na literatura relata a atividade anti-helmíntica do elatol em larvas L4 de *Nippostrongylus brasiliensis*, entretanto, não foi realizada uma curva de sobrevivência na presença do composto e nem os efeitos morfológicos causados por ele foram analisados (DAVYT *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito morfológico deste metabólito de *Laurencia dendroidea*, o elatol, contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* (DOS SANTOS *et al.*, 2010) já foi avaliado. A exposição da forma promastigota da *L. amazonenses* ao elatol provocou uma série de danos ao protozoário como, inchaço das mitocôndrias, surgimento de vacúolos autofágicos, desorganização da membrana plasmática, alterações no retículo endoplasmático, entre outras lesões importantes que provocam a morte do organismo (DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Em nossos estudos, a maior concentração do elatol utilizada foi de 400 ng/ml, que equivale a concentração de 1,24 µM. Ensaio de citotoxicidade de outros estudos indicaram que a utilização de elatol em concentrações de 0,1 a

100 μM não apresentam toxicidade em células de mamíferos, como macrófagos da linhagem J774G8 (DOS SANTOS *et al.*,2010). Sendo assim, a utilização de elatol nas concentrações que testamos não são suficientes para causar danos nas células de mamíferos, e nem seriam tóxicas para um futuro tratamento em humanos.

7. Conclusão

Nesse estudo foi possível observar que o extrato da *Laurencia dendroidea* não apresentou resultados significativos no percentual de sobrevivência dos helmintos testados, contudo nos resultados obtidos em microscopia ótica foi visualizado que o extrato ocasionou diversos danos na morfologia do *C.elegans*. O elatol, desde as primeiras concentrações testadas, apresentou efeito causando a diminuição do percentual de sobrevivência dos *C.elegans*, e também foram vistas, por meio de análise da microscopia ótica, alterações severas na morfologia do *C. elegans*, principalmente na região da cutícula. E com isso, foi possível concluir que o extrato FOR e o elatol apresentam potencial anti-helmíntico.

8. Referências Bibliográficas

AGUIAR-SANTOS, A.M.; MEDEIROS, Z.; BONFIM, C.; ROCHA, A.C.; BRANDÃO, E.; MIRANDA, T.; OLIVEIRA, P.; SARINHO, E.S.C. Epidemiological assessment of neglected diseases in children: lymphatic filariasis and soil-transmitted helminthiasis. *J. Pediatr*, v.89,n.3, p.250-5,2013.

BIANCO, E.M.; KRUG, J.L.; ZIMATH, P.L.; KROGER, A.; PAGANELLI, C.J.; BOEDER, A.M.; DOS SANTOS, L.; TENFEN, A.; RIBEIRO, S.M.; KUROSHIMA, K.N.; ALBERTON, M.D.; DE CORDOVA, C.M.M.; REBELO, R.A. Antimicrobial, antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms - evaluation of extracts and pure compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.25, p.668-676,2015.

BRAZ, A.S.; DE ANDRADE, C.A.F.; DA MOTA, L.M.H.; LIMA, C.M.B.L.; Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes. *REV BRAS REUMATOL*, v.55, n.4, p.368-380, 2015.

BRENNER, S. (1974). *Genetics*, 77: 71-94.

DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN,L.; MOMBRÚ,A.W.; SALDAÑA, J. DOMINGUEZ,L.; COLL,J.; FUJII, M.T.; MANTA, E.; New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination and anthelmintic activity. *J. Nat. Prod*, v.64, p. 1552-1555,2001. .

DE ANDRADE, E.C.; LEITE, I.C.G. RODRIGUES, V.O., CESCA, M.G.; Parasitoses intestinais: Uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Rev. APS*, v.13, n.2, p.231-240, 2010.

DE SOUZA,A.I.; FERREIRA, L.O.C.; BATISTA, M.F.; DIAS, M.R.F.S.; Enteroparasitoses, Anemia e Estado nutricional em grávidas atendidas em serviço público de saúde. *RBGO*, v.24, n.4, p.253-259,2002.

DOS SANTOS, A.O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO,B.P.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V.; Effect of Elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea* on *Leishmania amazonenses*. *Mar. Drugs*, v.8,p.2733-2743,2010.

DOS SANTOS, M.G.; MOREIRA, M.M.; MALAQUIAS, M.L.G.; SCHALL, V.T.; Educação em saúde em escolas publicas de 1º grau da periferia de Belo Horizonte, MG, Brasil. REV. INST.MED. trop. São Paulo, v.35,n.6, p. 573-579,1993

FERRAZ, R.R.N.; BARNABÉ,A.S.; PORCY,C.; D'EÇA, A.J.; FEITOSA,T.; FIGUEIREDO, P. M.; Parasitoses intestinais e baixos índices de Gini em Macapá (AP) e Timon (MA), Brasil. Cad. Saúde Colet, v.22,n.2, p. 173-6,2014. .

FREI, F.; JUNCANSEN, C.; PAES-RIBEIRO, J.T.; Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático. Cad. Saúde Publica, v.24, n.12, p.2919-2925, 2008.

GIATTI, L.L.; ROCHA, A.A.; DOS SANTOS, F.A.; BITENCOURT, S.C.; PIERONI, S.R.M.; Condições de saneamento básico em Iporanga, Estado de São Paulo. Rev Saúde Publica, v.38,n.4, p.571-7,2004.

HALTON, D.W.; Microscopy and the helminth parasite. Micron, v.35,p.361-390, 2004.

HU, Y.; ELLIS, B.L.; YIU, Y.Y.; MILLER, M.M.; URBAN, J.F.; SHI, L.Z.; AROIAN, R.V. An extensive comparison of the effect of anthelmintic classes on diverse nematodes. PLOS ONE, v.8,n.7,2013

JIANG, Y.; CHEN, J.; WU, Y.; WANG, Q.; LI, H. Sublethal toxicity endpoints of heavy metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*. PLOS ONE, v.10,n.1371. 2016.

LHULLIER, C.; DONNANGELO,A.; CARO,M.; PALEMO,J.A.; HORTA,P.A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL,E.P.; Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. Biochemical Systematics and Ecology, v.37,p.254-259,2009.

KATIKI, L.M.; FERREIRA,J.F.S.; ZAJAC, A.M.; MASLER,C.; LINDSAY, D.S.; CHAGAS, A.C.S.; AMARANTE,A.F.T. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintic for veterinary use.Veterinary Parasitology, v.182, p. 264-268,2011.

KLAUCK, V.; PAZINATO,R.; LOPES,L.S.; CUCCO, D.C.; DE LIMA,H.L.; VOLPATO,A.; RADAVELLI,W.M.; STEFANI, L.C.M.; DA SILVA, A.S.;

Trichostrongylus and Haemonchus anthelmintic resistance in naturally infected sheep from southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n.2, p. 777-784, 2014

KOHLER, P. (2001). *Int. J. Parasitol.*, 31: 336 – 345.

MACHADO, F.L.S.; LIMA, W.P.; DUARTE, H.M.; ROSSI-BERGMANN, B.; GESTINARI, L.M.; FUJII, M.T.; KAISER, C.R.; SOARES, A.R. Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Rev.Bras. Farmacogn*, v. 24, p.635-643, 2014.

MACHADO, F.L.S.; VENTURA, T.L.B.; GESTINARI, L.M. S.; CASSANO,V.; RESENDE, J.A.L.C.; KAISER, C.R.; LASUNSKAIA,E.B.; MUZITANO,M.F.; SOARES,A.R. Sesquiterpenes from the Brazilian Red alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Molecules*,v. 19,p. 3181-3192, 2014.

MACHADO, R.C.; MARCARI, E.L.; DE FATIMA, S.; CRISTANTE, V.; CARARETO, C.M.A.; Giardiase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1° e 2° (publicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.6, p. 697-704,1999.

MANKE, M.B.; DHAWALE,S.C.; JAMKHANDE, P.G.; Helminthiasis and medicinal plants: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v.5,n.3, p.175-180,2015.

MARTIN, R.J.; Modes of Action Anthelmintic Drugs. *The Veterinary Journal*, v.154, p.11-34,1997.

MELO,V.F.P.; PINHEIRO, R.S.B.; HOMEM JUNIOR. A.C.; AMÉRICO,J.H.P.; SANTOS,V.C.; ROSESTOLATO, L.L.R.; Manejo de anti-helmínticos no controle de infecções gastrintestinais em cabras. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*, v.16, n.4, p.916-924, 2015.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S.; Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

ORSO, P.D.; CANTOU, V.; ROSANO,K.; DE LOS SANTOS, K.; FERNANDEZ,N.; BERAZATEGUI, R.; GIACHETTO, G.; *Ascaris lumbricoides*,

complicaciones graves em niños hospitalizados em el Centro Hospitalario Pereira Rossel. ARCH Pediatr Urug, v.85, n.3, p. 149-154, 2014.

ROBERTS, L. S. & JANOVY, J. JR. (2009). Foundations of Parasitology. 6ªedição, McGraw-Hill, Boston, 670 pp.

SANT'ANNA, V.; VOMMARO, R.C.; DE SOUZA, W. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. Experimental Parasitology, v.135, p.1-8,2013.

SUDATTI, D.B.; FUJII, M.T.; RODRIGUES, S.V.; TURRA, A.; PEREIRA, R.C.; Effetcts of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J.Agardh (Ceramiales, Rhodophyta), Mar. Biol, v.158, p.1439-1446,2011.

SUZUKI, M.; TAKAHASHI, Y.; NAKANO,S.; ABE, T.; MASUDA, M.; OHNISHI, T.; NOYA,Y.; SEKI, K.; An experimental approach to study the biosynthesis of brominated metabolites by the red algal genus *Laurencia*. Phytochemistry, v.70,p.1410-1415, 2009.

VEIGA-SANTOS,P.; PELIZZARO-ROCHA,K.J.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; SILVA, S.O.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. *In vitro* anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. Parasitology, v.137, p.1661-1670, 2010.

VIGNADUZZO,S.E.; OPERTO,M.A.; CASTELLANO, P.M. Development and Validation of a Dissolution Test Method for Albendazole and Praziquantel in their combined dosage form. J. Braz. Chem, v.26, n.4, p.729-735, 2015.

ZIEGELBAUER, K.; SPEICH,B.; MAUSEZ AHL, D.; BOS, R.; KEISER,J.; UTZINGER,J.; Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: Systematic review and meta-analysis. PLOS MEDICINE, v.9,n.1,2012.

Figura 4 - Morfologia de *C. elegans* adulto não tratado e tratado com DMSO 0,1%

(A,B) *C. elegans* na fase adulta na condição controle. Região anterior (RA) mostrando o aparelho bulbo-faríngeo. Barra 5 μ m.

(C,D) *C. elegans* na fase adulta tratado com DMSO 0,1 %. Abertura oral (AO) e Região anterior (RA) mostrando o aparelho bulbo-faríngeo. Barra 5 μ m.

Figura 5 - Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 25 e 50 ng/ml

- (A) *C. elegans* adulto tratado com FOR 25 ng/ml. Região anterior (RA) mostrando alterações cuticulares. Barra 5 μ m.
- (B) *C. elegans* adulto tratado com FOR 25 ng/ml. Região anterior (RA) apresenta deformações internas e alterações cuticulares. Barra 5 μ m
- (C) *C. elegans* adulto tratado com FOR 25 ng/ml. Região media do corpo mostrando alterações na cutícula (RC). Barra 5 μ m.
- (D,E) *C. elegans* adulto tratado com FOR 50 ng/ml. Região anterior (RA) apresentando alterações cuticulares. Barra 5 μ m.
- (F) *C. elegans* adulto tratado com FOR 50 ng/ml. Região posterior apresentando deformações internas e pregueamento na cutícula. Barra 5 μ m

Figura 6 - Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 100 ng/ml

(A,B) *C. elegans* adulto tratado com 100 ng/ml. Região anterior (RA) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(C) *C. elegans* adulto tratado com 100 ng/ml. Região posterior (RP) mostrando deformações na cutícula e desorganização interna. Barra 5 μ m.

Figura 7 - Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com FOR 200 ng/ml

(A,B) *C. elegans* adulto tratado com 200 ng/ml. Região anterior (RA) mostrando pregueamentos cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(C,D) *C. elegans* adulto tratado com 200 ng/ml. Região posterior (RP) mostrando deformações na cutícula e desorganização interna. Barra 5 μ m.

Figura 8 - Morfologia de *C. elegans* adulto tratado com elatol 25 e 50 ng/ml.

(A) *C. elegans* adulto tratado com 25 ng/ml. Região posterior (RP) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(B) *C. elegans* adulto tratado com 25 ng/ml. Região anterior (RA) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(C, D) *C. elegans* adulto tratado com 50 ng/ml. Região anterior (RA) e Abertura oral (AO) não apresentaram muitas alterações. Barra 5 μ m

Figura 9 - Morfologia de *C.elegans* adulto tratado com elatol 100 e 200 ng/ml

(A,C) *C. elegans* adulto tratado com 100 ng/ml. Região anterior (RA) mostrando deformações na cutícula e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(B) *C. elegans* adulto tratado com 100 ng/ml. Região posterior (RP) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(D) *C.elegans* adulto tratado com 200 ng/ml. Região posterior (RP) e região anterior (RA) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.

(E,F) *C.elegans* adulto tratado com 200 ng/ml. Região anterior (RA) e Abertura oral (AO) mostrando alterações cuticulares e desorganização interna. Barra 5 μ m.