

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS QUINOLÍNICAS

Suelen Michiles MONTEIRO¹

Adrian Martin POHLIT²

Luiz Francisco Rocha e SILVA³

Bolsista PIBIC/CNPq¹; Orientador INPA²;

Colaborador INPA³

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças parasitárias que afligem o homem, a malária é talvez a mais antiga, a de maior distribuição e a mais conhecida. O nome malária tem origem latina e literalmente significa “ar ruim”, pois se acreditava que a doença resultasse de emanções de pântanos. (Neves 1998; Veronesi 1991). Os parasitas da malária pertencem ao gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Eucocciida. Das 150 espécies de *Plasmodium* descritas, prioritariamente seis parasitam o homem: *P. malarie*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e os mais recentemente descritos *P. knowlesi* e *P. cynomolgi* (Ta et al. 2014). A resistência do *Plasmodium* spp. às drogas utilizadas no tratamento de primeira e segunda linha para malária constituem um sério problema de saúde pública e é considerado o principal entrave para o controle e erradicação desta doença (Gama et al. 2011). Esse fenômeno destaca a importância de buscar novas estratégias para o tratamento da malária, sobretudo das cepas multi-resistentes de *P. falciparum*. Testes *in vitro* em culturas de *P. falciparum* constituem uma ferramenta importante para se triar novas drogas para malária. Os alcalóides representam uma interessante e importante classe de compostos com uma gama de atividades biológicas bem conhecidas. Estudos de *screening* tem revelado que vários alcalóides indólicos apresentam atividade antimalárica *in vitro* com IC₅₀ na faixa submicromolar, e com ótimos índices de seletividade (Frederich et al. 2008; Kaur et al. 2009; Passemar et al. 2011; Wright 2005). Elipticina e olivacina são exemplos de alcalóides indólicos com comprovada atividade antimalárica *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes a cloroquina. A quinina é o mais importante alcalóide antimalárico já descoberto e foi isolado da planta peruana *Chinchona* spp. no século XVI. A partir da estrutura básica quinolínica da quinina foram concebidas as estruturas das diversas substâncias quinolínicas utilizadas hoje para o tratamento da malária, como a cloroquina, a mefloquina e a primaquina (Pohlit et al. 2013). No presente trabalho foram testados para atividade antimalárica *in vitro* frente o *P. falciparum* substâncias quinolínicas buscando-se identificar possíveis protótipos para novas drogas antimaláricas.

MATERIAL E MÉTODOS

As substâncias quinolínicas testadas neste projeto foram fornecidas pelo LAPAAM (Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia) e colaboradores. O estudo farmacológico de atividade antimalárica das substâncias foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue – INPA. A metodologia de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* utilizada é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976), e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Foram utilizadas as cepas K1 (MRA-159) cloroquino-resistente e 3D7 (MRA-102) cloroquino-sensível. Após a realização do descongelamento os parasitos foram mantidos a 37 °C em garrafas de poliestireno sob mistura de gases (5% de CO₂, 5% de O₂ e N₂ balanceado), suspensão de eritrócitos e meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de plasma humano tipo A+. A parasitemia foi monitorada pela contagem microscópica dos parasitos num total de 1000 hemácias em esfregaço sanguíneo. Para o bioensaio de atividade antiplasmódica foi utilizada a técnica de Desjardins et al. (1979) com modificações descritas em

Andrade-Neto *et al.* (2007). Inicialmente, foram preparadas soluções-mãe das substâncias de interesse, em DMSO na concentração de 5 mg/mL. Esta solução foi posteriormente diluída em sete concentrações de teste, variando entre 100,0 e 1,56 µg/mL. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 µL das soluções teste e acrescentados 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas com parasitemia inicial de 1% e hematócrito de 2%, encerrando um volume final no poço de 200µL. Poços controle presentes na placa não receberam as substâncias testes e representaram 100% do crescimento. As placas foram incubadas por 48h a 37 °C e baixa tensão de O₂ (mistura carbogênica) em câmara acrílica e estufa bacteriológica. Após o período de incubação, foram feitos e corados esfregaços sanguíneos do conteúdo dos poços da placa seguindo-se a leitura microscópica para contagem dos parasitas. As parasitemias resultantes dos poços teste foram comparadas com as parasitemias dos poços controle para se avaliar o potencial de inibição de cada concentração de amostra. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação da média de duplicata de cada concentração, com a média dos controles sem droga, e a CI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento) foi calculada mediante regressão linear utilizando o software Wicrical Origin®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram ensaiados para atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 (cloroquino-resistente) de *P. falciparum* oito alcaloides quinolínicos. Os resultados do teste *in vitro* estão apresentados na Tabela 1 na forma de concentração inibitória 50% (CI₅₀) em micromolar.

Tabela 1. Concentração inibitória 50% (IC₅₀) *in vitro* de 11 derivados quinolínicos frente as cepa K1 e 3D7 de *P. falciparum*.

Códigos	Classificação da atividade K1/3D7	IC ₅₀ (µg/mL)	
		K1	3D7
PV-155	I/I	33,0 ± 5,0	22,0 ± 7,0
PV-156	I/I	>50,0	48,5 ± 13,0
PV-160	A/PA	6,5 ± 3,0	22,1 ± 5,0
PV-161	A/A	8,9 ± 4,0	11,5 ± 2,0
PV-162	PA/A	19,4 ± 6,0	13,7 ± 3,0
PV-163	PA/PA	22,0 ± 3,0	17,4 ± 6,0
PV-164	I/I	>50,0	>50,0
PV-165	A/PA	12,3 ± 4,0	18,7 ± 3,0
PV-166	I/A	39,6 ± 10,0	5,5 ± 2,0
PV-0203	A/A	10,3 ± 2,0	5,7 ± 1,0
PV0204	I/PA	38,8 ± 12,0	25,9 ± 5,0
Cloroquina (difosfato)		0,3 ± 0,1	0,09 ± 0,02

*Como critério de atividade *in vitro* foi estabelecido que as amostras com IC₅₀ de:

< 1 µg/mL - Muito Ativo (MA)

1 a 15 µg/mL – Ativo (A)

16 a 30 µg/mL - Parcialmente Ativo (PA)

Entre as substâncias testadas, cinco mostraram-se inativas ou parcialmente ativas frente às duas cepas utilizadas no estudo. As substâncias PV- 161 e PV-0203 foram as que apresentaram melhores resultados frente às duas cepas testadas, sendo consideradas ativas com CI₅₀ variando entre 11,5 e 5,7 µg/mL, sendo este último valor atribuído à

substância PV-0203 para a cepa 3D7. As substâncias PV- 160 e PV- 165 foram ativas para a cepa K1, e tiveram sua atividade diminuída frente a cepa 3D7. É importante notar a presença do bromo na substância PV-160. Este halogênio também conferiu maior atividade antimalárica para derivados de elipticina testados frente a cepas de *P. falciparum in vitro*, conforme relatos da literatura (Montoia *et al.* 2014). As estruturas dos compostos testados estão apresentadas na figura 1. A estrutura quinolinica básica da quinina foi utilizado para conceber o desenvolvimento de todas as aminoquinolinas sintéticas: cloroquina, primaquina, mefloquina, tafenoquina e outras com grande potencial farmacológico (Vale *et al.* 2005). Neste trabalho foram testadas substâncias com o mesmo núcleo quinolinico da quinina, porém as mesmas não apresentaram uma atividade significativa, o que reforça importância de se testar outros derivados desta classe química.

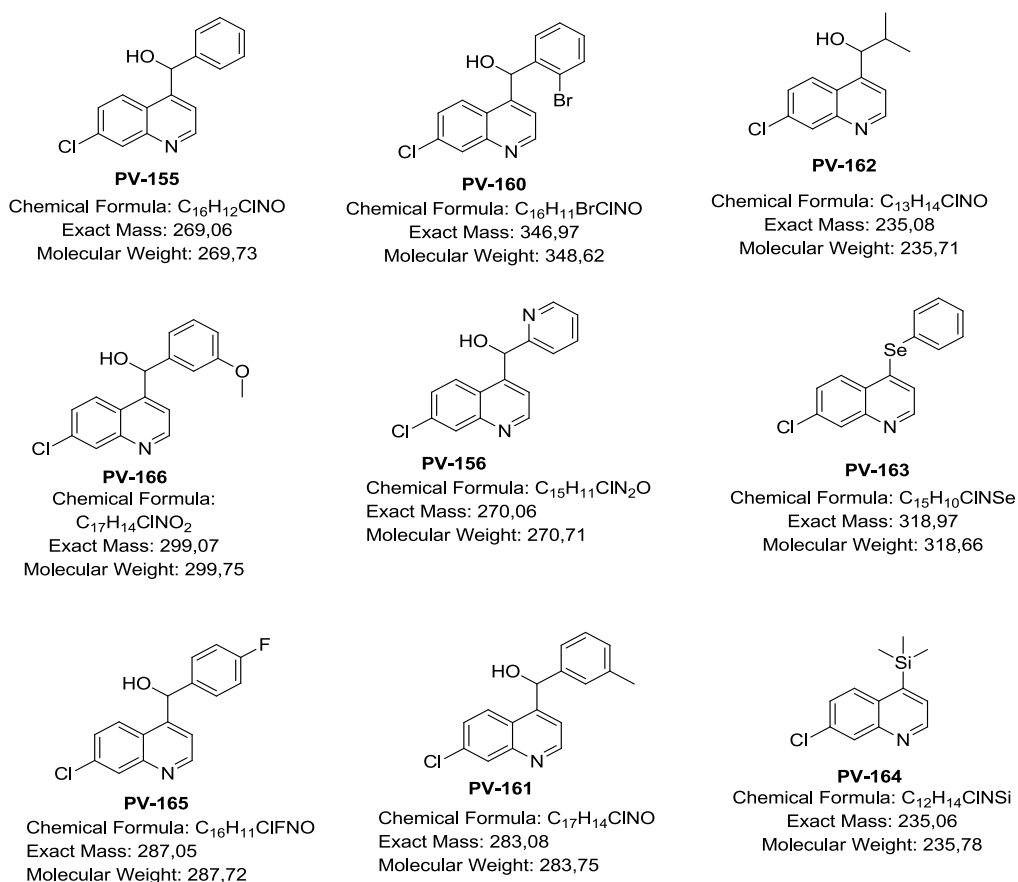


Figura 1. Estrutura química dos compostos quinolinicos testados.

CONCLUSÃO

Das 11 substâncias quinolínicas testadas neste trabalho, duas se mostraram ativas frente às cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum*. Embora as substâncias aqui testadas não tenham apresentado atividade antimalárica semelhante às principais aminoquinolinas utilizadas como droga, espera-se no futuro produzir novos derivados quinolínicos com maior atividade antimalárica.

REFERÊNCIAS

- Andrade-Neto, V.F.; Pohlit, A.M.; Pinto, A.C.S; Silva, E.C.; Nogueira, K.L.; Melo, M.R.; Henrique, M.C.; Amorim, R. C.N; Silva, L.F.; Costa, M.R.; Nunomura, R.C.; Nunomura, S.M.; Alecrim, W.D.; Alecrim, M.G.; Chaves, F.C.; and Vieira, P.P. 2007. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102(3): 359-365.
- Dos Santos Torres, Z. E.; Silveira, E.R.; Rocha, E.S.L.F.; Lima, E.S.; de Vasconcellos, M.C.; de Andrade Uchoa, D.E.; Filho, R.B.; Pohlit, A.M. 2013. Chemical Composition of *Aspidosperma ulei* Markgr and Antiplasmodial Activity of Selected Indole Alkaloids. *Molecules*, 18: 6281- 6297.
- Desjardins, R.E.; Canfield, C.J.; Haynes, J.D.; Chulay, J.D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemother*, 16(6): 710-718.
- Frederich, M.; Tits, M.; and Angenot, L. 2008. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(1): 11-19.
- Gama, B.E.; Lacerda, M.V.G.; Daniel Ribeiro, C.T.; and Ferreira da Cruz, M.F. 2011. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106(I): 159- 166.
- Kaur, K.; Jain, M.;Kaur, T.; and Jain, R. antimalarial from nature. 2009. *Bioorg Med Chem*, 17(9): 3229 – 3256.
- Montoia, A.; Rocha, E.S.L.F.; Torres, Z.E.; Costa, D.S.; Henrique, M.C.; Lima, E.S.; Vasconcellos, M.C.; Souza, R.C.; Costa, M.R.; Grafov, A.; Grafova, I.; Ebelin, M.N.; TadeiA, W.P.; Amorim, R.C.; and Pohlit, A.M. 2014. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. *Bioorg Med Chem Lett*, 24(12): 2631-2634.
- Neves, P.D. 1998. *Parasitologia Humana*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1998, 345p.
- Passemar, C.; Salery, M.; Soh, P.N.; Linas, M.D.; Ahond, A.; Poupat, C.; and Benoit-vical, F. 2011 Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine*, 18(13): 1118-25.
- Pohlit, A.M.; Lima, R.B.S.; Frausin, G.; Silva, L.F.R.; Lopes, S.C.P.; Moraes, C.B.; Cravo, P.; Lacerda, M.V.G.; Siqueira, A.M.; Freitas-Junior, L.H.; Costa, F.T.M. 2013. Amazonian Plant Natural Products: Perspectives for Discovery of New Antimalarial Drug Leads. *Molecules*, 18(8): 9219-9240.
- Ta, T.H.; Hisam, S.; Lanza, M.; Jiram, A.I.; Ismails, N.; and Rubio, J.M. 2014. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*, 13(1): 68.
- Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. 2005. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. *Qui Nova*, 99: 57-69.
- Veronesi, R. 1991. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 199, 543p.
- Trager, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254): 673- 75.
- Wright, C.W. 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J Ethnopharmacol*, 100(1-2):67-71.