

## ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *In Vitro* DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE PLANTAS AMAZÔNICAS E DE SEUS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS.

David Siqueira da COSTA<sup>1</sup>; Luiz Francisco Rocha e SILVA<sup>2</sup>; Ana Cristina da Silva PINTO<sup>2</sup>; Rodrigo César das Neves AMORIM<sup>2</sup>; Mônica Regina da Costa MANSO<sup>3</sup>; Adrian Martim POHLIT<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Colaborador COTI/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora FMT-HVD; <sup>4</sup>Orientadora COTI/INPA

### 1.Introdução

O agente etiológico da malária é um parasito do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e o mais recente descoberto, *P. knowlesi* (Singh et al. 2004). A transmissão ao homem ocorre por meio da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* no momento do repasto sanguíneo. No Brasil, cinco espécies são consideradas como vetores principais; *A. (nyssorhynchus) Darling*, *A. (nyssorhynchus) Albitarsis*, *A. (nyssorhynchus) aquasalis*, *A. (Kerteszia) Cruzei*, *A. (Kerteszia) Bellatr* (Ferreira 2005). A doença esta presente, também, em mais de 90 países ao redor do globo, embora com prevalências diferentes. No Brasil 99% dos casos registrados tem se restringido a Amazônia (Ministério da Saúde 2010). Alguns produtos naturais da região Amazônica possuem atividade antimalárica comprovada cientificamente. Andrade-Neto et al. (2007) avaliou a atividade antimalárica *in vitro* de quatro substâncias frente à cepa K1 de *P. falciparum*. Todas foram consideradas ativas ao apresentarem CI<sub>50</sub> (Concentrações que inibem 50% do crescimento do parasita) inferior a 1µM (Andrade-Neto et al. 2007). Em geral, produtos naturais modificados (semissintéticos), podem ser úteis para o desenvolvimento de novas drogas, visto que as principais drogas antimaláricas utilizadas hoje foram inspiradas em produtos naturais como a quinina e a artemisinina, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de extratos, substâncias extraídas de plantas Amazônicas e seus derivados semissintéticos.

### 2.Material e Métodos

O estudo químico foi realizado no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) pela equipe de químicos coordenada pelo Dr. Adrian Pohlit. As substâncias utilizadas foram o 4-nerolidilcatecol (1) isolado das raízes de *Piperpeltata*, um derivado O,Odi-acetil de 1 (2), e os alcaloides elipticina (3) e olivacina (4) isolados das cascas de *Aspidospermavargasii* e *A. Olivaceum* respectivamente. Foram utilizadas também as drogas padrão cloroquina, quinina, artemisinina e controles. A metodologia de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* utilizada é uma modificação da técnica de Trager & Jensen (1976) adaptado pelo laboratório de malária da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Após descongelamento, os parasitos foram mantidos a 37°C em garrafas de poliestireno de 25 mL, às quais foi adicionada uma mistura de gases para manter uma micro atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> balanceado). Em cada garrafa de cultivo foi adicionada suspensão de eritrócitos suficiente para a obtenção de 500 µL de sangue parasitado (suspensão de eritrócitos tipo A+ a 5% (v/v) em um hematócrito de 50 %) e 4,5 mL de solução composta por meio RPMI 1640 suplementado com 32 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), 12 mM TES (ácido sulfônico-N-tris[hidroximetil]-metil-2-aminoetano), 37 mM Mhipoxantina, 2 mM glutamina, 10 mM glicose e 10% de plasma humano tipo A+. Foi realizada troca diária de meio RPMI enriquecido com plasma humano inativado. Todo o procedimento de descongelamento e manutenção das culturas foi feito em ambiente de total assepsia (câmara de fluxo laminar). A adição de suspensão de hemácias não parasitadas foi feita em períodos de 48 h, sempre que a cultura apresentava predomínio de esquizontes e/ou parasitemia maior do que 2%. Primeiramente os parasitos foram sincronizados para o estágio trofozoíta na forma de anel pelo tratamento com sorbitol (Lambros e Vanderberg 1979). O bioensaio de atividade antimalárica foi originalmente desenvolvido por Desjardinet al. (1979), e tem sido um dos testes mais utilizados para a avaliação do potencial de compostos antimaláricos. Para o *screening* de substâncias que foram testadas pela primeira vez, utilizou-se duas concentrações, 50 a 5 µg/mL, em triplicata. As substâncias que se mostraram ativas foram testadas em sete concentrações em duplicata. Em uma microplaca contendo 96 poços, foram adicionados 20 µL das soluções teste e posteriormente acrescentados 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas, com uma parasitemia de 1% e hematócrito de 3 %, encerrando um volume total no poço de 200 µL. Controles foram preparados substituindo-se a solução estoque por DMSO ou pelos antimaláricos cloroquina ou quinina (controle positivo). As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> por 48 h. A parasitemia em cada poço foi determinada pelo exame do esfregaço sanguíneo corado pelo método do panótico em microscópio óptico, com objetiva de 100x. A parasitemia foi expressa em porcentagem de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 3000 hemácias e a inibição também foi expressa em porcentagem.

### 4.Resultados e Discussão

As cepas de *P. falciparum* K1 (cloroquino-resistente) e 3D7 (cloroquino-sensível) são frequentemente utilizadas em estudos *in vitro* por apresentarem perfis de sensibilidade conhecidos e constantes. Inicialmente, foram testadas as drogas cloroquina, quinina e artemisina, com a finalidade de validação do método e comparação com as demais substâncias testadas. O perfil de sensibilidade das cepas K1 e 3D7 à cloroquina foi confirmado, assim como os  $CI_{50}$  destas à quinina e artemisinina estão compatíveis com a literatura conforme apresentado na Tabela 1 (Andrade-Neto *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2011).

As substâncias **1-4** tiveram sua atividade antiplasmodial *in vitro* avaliada frente às duas cepas de *P. falciparum*. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. O composto **1** apresentou uma  $CI_{50}$  de 0,65  $\mu$ M frente a cepa K1 e 0,74  $\mu$ M frente a cepa 3D7. **1** é metabólito secundário das folhas e raízes de *P. peltata*. A planta é amplamente utilizada na região amazônica por suas propriedades antiinflamatórias e antimaláricas, esta última atividade sendo atribuída a **1**. Esta atividade foi confirmada por Andrade-Neto *et al.* (2007) onde **1** apresentou uma  $CI_{50}$  frente à cepa K1 de 0,67  $\mu$ M, e por Rocha e Silva *et al.* (2011) onde a  $CI_{50}$  frente a cepa 3D7 foi de 1,15  $\mu$ g/mL. A metodologia de testes *in vitro* utilizada neste estudo apresentou resultados similares aos descritos na literatura conforme exposto acima. O composto **1** é instável em condições normais de laboratório. Visando melhorar sua atividade e estabilidade, Pinto *et al.* (2009), produziram vários derivados de **1**, dos quais alguns apresentaram significativa atividade antimalárica. Aqui o derivado *O,O*-diacetilado de **1**, neste estudo denominado **2**, foi testado, e apresentou uma atividade moderada com uma  $CI_{50}$  de 4,8  $\mu$ M frente a cepa K1 conforme demonstrado na Tabela 1. Embora, a atividade antimalárica de **2** tenha diminuído em relação ao composto original, **2** consegue ser muito mais estável. Estudos *in vivo* serão necessários para avaliar qual dos compostos seria um melhor protótipo para antimaláricos.

**Tabela 1.**  $CI_{50}$  das drogas padrão e produtos naturais frente às cepas K1 e 3D7

| Nome do composto   | $CI_{50}$ ( $\mu$ M) |       |
|--|----------------------|-------|
|  | K1                   | 3D7   |
| 4-Nerolidilcatecol ( <b>1</b> )                          | 0,65                 | 0,74  |
| 4-Nerolidilcatecol- <i>O,O</i> -diacetilado ( <b>2</b> ) | 4,8                  | 5,4   |
| Elipticina ( <b>3</b> )                                  | 0,81                 | 0,35  |
| Olivacina ( <b>4</b> )                                   | 1,42                 | 1,2   |
| Cloroquina (difosfato)                                   | 0,13                 | 0,06  |
| Quinina (sulfato)  | 0,16                 | 0,11  |
| Artemisinina   | 0,002                | 0,001 |

A potente atividade antimalárica de **3** anteriormente reportada por Andrade-Neto *et al.* 2007 foi confirmada aqui, onde **3** apresentou um  $CI_{50}$  de 0,81  $\mu$ M e 0,35  $\mu$ M frente a cepa K1 e 3D7, respectivamente. **3** está presente nas cascas de *A. vargasii*. Na Amazônia muitas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígena e cabocla por suas propriedades medicinais. A infusão da casca de algumas espécies, como *A. nitidum* e *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron*, é utilizada no tratamento da malária (Henrique *et al.* 2010). **4** é um raro alcalóide indólico isolado de *A. olivaceum*, amplamente estudado por suas propriedades anti-câncer, porém sua atividade antimalárica parece não ter sido descrita anteriormente. **4** apresentou uma inibição significativa do crescimento do parasita ( $CI_{50} = 1,42 \mu$ M para cepa K1). As curvas de dose resposta de **3** e **4** frente à cepa 3D7 de *P. falciparum* estão representadas na Figura 1. A produção e avaliação de derivados semissintéticos é uma etapa importante no desenvolvimento de novos fármacos. As mais importantes drogas utilizadas hoje para o tratamento da malária são análogos sintéticos de produtos naturais como os alcalóides quinolínicos e os derivados de artemisinina. Visto que os compostos naturais aqui testados apresentaram uma atividade significativa, torna-se pertinente e necessário a produção e avaliação de derivados semissintéticos inspirados nestes compostos (França *et al.* 2008).

**Figura 1:** Curva de concentração-resposta dos alcalóides indólicos **3** e **4** frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*.

#### 4. Conclusão

A busca de atividade antimalárica em compostos isolados de plantas amazônicas é uma importante atividade que pode conduzir à descoberta de novas drogas a serem produzidas na região. Todos os compostos aqui testados apresentaram uma importante atividade frente às cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum*. Os compostos naturais **1** e **3** já haviam sido testados antes e tiveram seus níveis de inibição confirmado por este estudo. Composto **3** embora conhecido, teve sua atividade antimalárica *in vitro* demonstrada pela primeira vez neste estudo. **2** é o único derivado semissintético avaliado aqui, e apresentou uma atividade *in vitro* moderada.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Andrade-Neto, F.V.; Pohlit, M.A.; Pinto, A.C.S.; Silva, E.C.; Nogueira, K.L.; Melo, M.R.S.; Henrique, M.C.; Amorim, R.C.N.; Silva, L.F.R.; Costa, M.R.F.; Nunomura, R.C.S.; Nunomura, S.M.; Alecrim, W.D.; Alecrim, M.G.C.; Chaves, F.C.M.; Vieira, P.P.R. 2007. *In vitro* of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(3): 559-65.
- Andrade-Neto, V.F.; Brandao, M.G.; Nogueira, F.; Rosario, V.E.; Krettli, A.U. 2008. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol* 38, 1505-1511.
- Amorim, R.C.N.; Silva, L.F.R.; Costa, M.R.F.; Nunomura, R.C.S.; Nunomura, S.M.; Alecrim, W.D.; Alecrim, M.G.C.; Chaves, F.C.M.; Vieira, P.P.R. 2007. *In vitro* of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(3): 559-65.
- Braga, E. M.; Fontes, C. J. F. 2002. *Plasmodium*-malária, *Parasitologia humana*. 10 ed, 128-146.
- Singh, B.; Lee, K.S.; Matusop, A.; Radhakrishnan, A.; Shamsul, S.S.G.; Singh, J. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*; 363:1017-1024.
- Desjardins, R.E.; Canfield, C.J.; Haynes, J.D.; Chulay, J.D. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* y a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:10-18.

- França, T.C.C.; Santos, M.G.; Figueroa-Villar, J.D. 2008. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova* 31, 1271-1278.
- Ferreira, M.S. 2005. Malária: Conceito, Etiologia e Ciclo Evolutivo. Veronesi, Tratado de infectologia. 3º ed. São Paulo: Editora Atheneu, P.1589-93.
- Henrique, M.C.; Nunomura, S.M.; Pohlit, A.M. 2010. Alcalóidesindólicos das cascas de *Aspidospermavargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova* 33, 2284-2287.
- Lambros, C.; Vanderberg, J.P. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol*, 418-20.
- Ministério da Saúde, BRASIL. 2010. Guia Prático de tratamento da malária no Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. 1. Ed. p 36.
- Rocha, E.S.L.F.; Silva Pinto, A.C.; Pohlit, A.M.; Quignard, E.L.; Vieira, P.P.; Tadei, W.P.; Chaves, F.C.; Samonek, J.F.; Lima, C.A.; Costa, M.R.; Alecrim, M.G.; Andrade-Neto, V.F. 2011. In vivo and in vitro antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. *Phytother Res* 25, 1181-1188.
- Trager, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254): 673-75.