

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE ALCALOIDES INDÓLICOS E SEUS DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS

Suelen Michiles MONTEIRO¹
Adrian Martin POHLIT²
Luiz Francisco Rocha e SILVA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador INPA; ³Co-Orientador INPA

INTRODUÇÃO

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Os parasitas da malária pertencem ao gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucocciida. Das 150 espécies de *Plasmodium* descritas, prioritariamente seis parasitam o homem: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e os mais recentemente descritos *P. knowlesi* e *P. cynomolgi* (Ta et al. 2014). A transmissão natural ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo o *Anopheles darlingi* a espécie mais importante para Amazônia (Ministério da Saúde 2010). A complexidade do ciclo de vida do parasita aliada a resistência que os parasitos tem apresentado aos antimaláricos tradicionais tem contribuído para as enormes dificuldades experimentadas no controle e erradicação da doença (Gama et al. 2011).

Os alcaloides indólicos são substâncias naturais com larga atividade biológica, e nas últimas décadas vem sendo estudadas no contexto da malária. Estudos de *screening* tem revelado que várias substâncias desta classe apresentam atividade antimalárica *in vitro* com CI_{50} (concentração inibitória mediana) na faixa submicromolar e com ótimos índices de seletividade. (Frederich et al. 2008; Kaur et al. 2009). A elipticina é um alcalóide indólico natural isolado das cascas de *Aspidosperma vargasii*, cuja atividade antiplasmodial foi descoberta pelo nosso grupo, e exibiu uma significativa atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum*, com um CI_{50} de 73 μ M. (Andrade-Neto et al. 2007; Henrique et al. 2010; Pohlit et al. 2013). Rocha e Silva et al (2012), confirmaram a atividade antimalárica *in vitro* de elipticina e revelaram atividade antimalárica *in vivo* deste e de outros alcaloides indólicos, mostrando que esta classe de substâncias apresentam grande potencial para se tornarem protótipos de novos antimaláricos. Este trabalho teve por objetivo geral avaliar a atividade antimalárica *in vitro* de alcaloides indólicos e seus derivados semissintéticos frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado mediante parceria interdisciplinar e interinstitucional entre a Fundação de Medicina Tropical – Heitor Viera Dourado-FMT-HVD (Gerência de Malária), e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, (Laboratório de Fitoquímica – COTI). Os alcaloides indólicos estudados foram obtidos comercialmente ou ainda derivados semi-sintéticos produzidos no LAPAAM (Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia/ INPA). As substâncias testadas foram carbazol, harmano, harmina, harmalina e hidrocloreto de harmalina di-hidratada e quatro derivados dessas substâncias CAEPI-123, HOPI- 119, HA- 1, HL-1 hidrocloreto de harmalina di-hidratada. A metodologia de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* utilizada é uma modificação da técnica de Trager e Jensen (1976) adaptado pelo laboratório de malária da FMT-HVD e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Foi utilizada a cepa K1 cloroquino-resistente. 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.

O bioensaio de atividade antiplasmodíaca foi originalmente desenvolvido por Desjardins et al. (1979). Inicialmente, foram preparadas soluções mãe das substâncias de interesse, em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração de 5 mg/mL. Esta solução foi posteriormente diluída para as concentrações de teste. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 μ L das soluções teste e acrescentados 180 μ L de suspensão de hemácias parasitadas com parasitemia inicial de 1% e hematócrito de 2%, encerrando um volume final no poço de 200 μ L. Poços controle presentes na placa não recebem 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. Foram feitos e corados esfregaços sanguíneos do conteúdo dos poços da placa seguindo-se a leitura microscópica para contagem dos parasitos. 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 CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento) foi calculada mediante regressão linear utilizando o software Wicrinal Origin®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias estudadas foram selecionadas por apresentarem núcleos indólicos (carbazólicos) tal como alguns alcaloides com notória atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*, como a elipticina, olivacina e criptolepina, as quais são heterocíclios constituídas por quatro anéis. As cinco substâncias estudadas inicialmente foram carbazol, harmano, harmina, harmalina e harmalina $HCl \cdot 2H_2O$ constituídas por três anéis, sendo estruturalmente mais simples que as primeiras substâncias citadas. Posteriormente foram preparados derivados desmetilados de harmina e harmalina e derivados epoxidados de carbazol e harmano. As estruturas das substâncias testadas estão representadas na Figura 1.

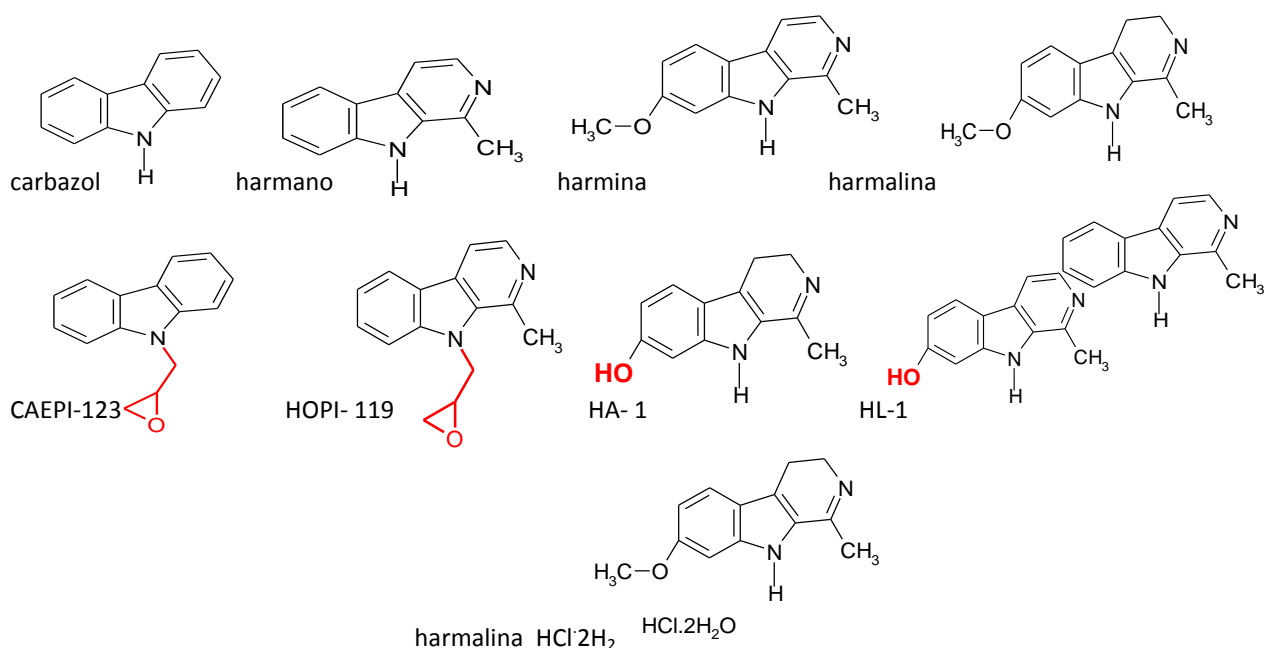


Figura 1. Alcalóides indólicos e derivados.

Os alcaloides indólicos foram ensaiados para atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 (cloroquino-resistente) de *P. falciparum*. A Tabela 1 apresenta a CI_{50} das substâncias em $\mu g/mL$ e μM . Entre as substâncias comercialmente adquiridas, os que apresentaram os melhores resultados foram o harmano, a harmalina e a harmina com atividade antiplasmodial significativas *in vitro* (CI_{50} 2,48, 3,38 e 3,60 $\mu g/mL$, respectivamente). Os derivados semi-sintéticos HL-1, HOPI-119, CAEPI-123 preparados respectivamente a partir de harmalina, harmano e carbazol apresentaram atividade inferior aos seus produtos originais. O derivado HA-1 preparado por desmetilação da harmina foi o único derivado que apresentou um pequeno aumento de atividade em relação ao produto original. A Figura 2 apresentou a curva de concentração-resposta do harmano que foi o composto mais ativo entre os testados.

Tabela 1. Concentração inibitória 50% (CI₅₀) *in vitro* de alcalóides indólicos frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

Códigos (PM)	Classificação* da atividade	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)
Carbazol (167)	I	6,56	39,2
Harmina (212)	A M	3,38	15,9
Harmalina (214)	A M	3,60	15,7
Harmalina HCl 2H ₂ O (289)	AM	5,8	20,2
Harmano (182)	I	2,48	13,6
HA -1(Harmina) (198)	AM	3,05	15,4
HL- 1(Harmalina) (200)	I	6,85	34,2
HOPI- 119 (Harmano) (238)	I	12,04	50,05
CAEPI – 123 (Carbazol) (223)	I	24	107,6
Difosfato de Cloroquina (515)	-	0,114	0,21
Sulfato de Quinina (345)	-	0,112	0,34

0.1 < CI₅₀ < 5 µM= ativo (A); CI₅₀ 5- 20 µM = atividade moderada (AM); CI₅₀ > 20.0 µM = inativo (I). (Dos Santos Torres *et al.* 2013).

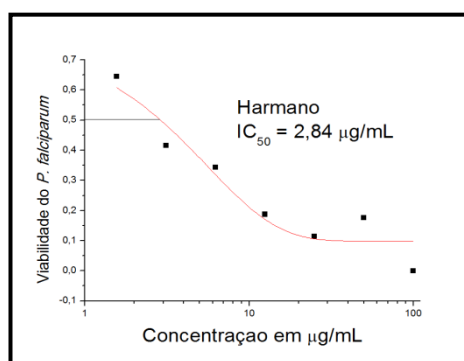


Figura 2. Curva de concentração-resposta do harmano frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

CONCLUSÃO

O principal interesse nas propriedades farmacológicas dos carbazólicos relaciona-se com a planaridade do sistema heterocíclico e conseqüentemente maior capacidade de interação com DNA e/ou interação/inibição da formação da hemozoína no parasito. Os alcaloides indólicos carbazólicos aqui testados apresentaram importante atividade antimalárica e suas estruturas podem servir de modelos para semi-síntese de novas drogas antimaláricas. O derivado semi-sintético HA-1 foi o que apresentou melhor atividade em relação ao seu composto original harmina.

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.; 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.
- Brasil. 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde.
- 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.; 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.; 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(1): 159- 166.
- Henrique, M.C.; Nunomura, S.M.; Pohlit, A.M. 2010. Alcaloides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, 33: 2284- 2287.
- Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. 2009. Antimalarial from nature. *Bioorg Med Chem*, 17(9): 3229 – 3256.
- Lambros, C.; Vanderberg, J.P. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol*, 65(3): 418- 420.
- 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.
- Trager, W.; Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254): 673- 75.