

## ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E CITOTÓXICA DE FÁRMACOS

Marcely Mendes de Sousa; Isabela Rodrigues Esteves; Amanda Luisa da Fonseca (Dra)

Saúde, UNA Bom Despacho, amanda.fonseca@una.br

### RESUMO

A malária é uma doença parasitária que acomete grande parte da população mundial. Na ausência de uma vacina eficaz, seu tratamento depende do uso de quimioterápicos e a necessidade de novos tratamentos é reforçada pela crescente resistência identificada aos antimaláricos atuais. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar, através de dinâmica molecular, o comportamento de inibidores sintéticos. Desta forma, os resultados apontam para uma correlação entre os resultados teóricos e experimentais, sugerindo que estes compostos podem ser usados para inibir, que é um potencial alvo farmacológico.

### INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária que acomete grande parte da população mundial. Na ausência de uma vacina eficaz, seu tratamento depende do uso de quimioterápicos e a necessidade de novos tratamentos é reforçada pela crescente resistência identificada aos antimaláricos atuais. A necessidade de acelerar os progressos na redução da malária é reconhecida e a OMS desenvolveu a estratégia técnica global (*Global Technical Strategy - GTS*) para a Malária 2016-2030, que estabelece uma visão para acelerar o progresso em sua eliminação e que é complementada pelo plano *Roll Back* de Malária, denominado *Action and Investment to defeat Malaria* (AIM) para combater a malária 2016-2030. Juntos esses documentos enfatizam: i) a necessidade de acesso universal às intervenções para a prevenção, diagnóstico e tratamento da malária; ii) todos os países devem acelerar os esforços para eliminação da malária e iii) que a vigilância da malária deve ser uma intervenção central. Com isso, reconhecem também a importância da inovação e da investigação, partilham as mesmas metas globais para 2030 e os mesmos marcos para 2020

e 2025. O relatório anual mundial sobre a malária de 2017 aponta à importância da atenção a malária, uma vez que houve um aumento do número de casos ([WHO 2022](#)).

## MÉTODO

### Cultivo *in vitro* das fases intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*

Cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) e cloroquina-sensível (3D7) serão cultivadas em hemárias humanas sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (TRAGER AND JENSEN 2005). Estas serão mantidas em placas de petri com meio RPMI-1640 suplementado com 25mM de Hepes, 21mM de bicarbonato de sódio, 300 $\mu$ M de hipoxantina, 2g/L de glicose, 40 $\mu$ g/ml de gentamicina, 10% (v/v) de plasma humano inativado (meio completo) e hematócrito a 5%.

As hemárias humanas serão fornecidas pelo Hemocentro, lavadas com meio RPMI incompleto através de centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos para retirada das células brancas. As placas de petri contendo os parasitos serão condicionadas à 37 °C em dissecadores, nos quais a concentração gasosa será obtida pela combustão de uma vela. Diariamente será realizada a troca de meio completo do cultivo.

A parasitemia será monitorada diariamente através de esfregaços sanguíneos em lâminas, secos ao ar, fixados com metanol e corados com Giemsa 0,93% em água tamponada em pH=6,8 (5 gotas de corante para cada 1mL de água tamponada). Após 20 minutos com o corante, o esfregaço será lavado em água corrente, seco ao ar novamente e levado ao microscópio óptico com aumento de 1000x para proceder à contagem. A parasitemia será estimada pelo número total de hemárias por campo microscópico em um total de 50 a 100 campos, estimando-se o número de hemárias infectadas.

Antes de cada teste de atividade antimalária, os parasitos cultivados serão sincronizados pelo método do sorbitol (LAMBROS and VANDERBERG 1979). Na placa de cultivo contendo o parasito, o meio será retirado e adicionado 10 mL de sorbitol e homogenizou-se o meio. Incuba-se a placa de petri em dissecador com níveis adequados de oxigênio a 37°C por 10 minutos. Após

esse tempo, será transferido todo o conteúdo para um tubo falcon de 15mL e centrifugou-se por 5 min. O sobrenadante será retirado e o sedimento ressuspensionado com meio RPMI suplementado com plasma humano (obtido do Hemocentro) inativado, ajustando-se o hematócrito para 2%. Posteriormente, será realizado um esfregaço sanguíneo para determinação da parasitemia. O hematócrito e a parasitemia, ambos a 2%, serão ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas. Esse método permitirá selecionar os trofozoítos jovens (anéis) e assim garantir que o composto teste atue logo no início do ciclo eritrocítico.

*Testes esquizonticidas in vitro com *Plasmodium falciparum* utilizando microteste tradicional*

As culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel e 2% de hematócrito distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning/EUA)/200µl por poço (volume final). Os compostos a serem testados serão adicionados em diferentes concentrações à placa contendo os parasitos. Inicialmente será realizada uma triagem com duas concentrações, 50 e 25µg/mL, para verificar se os compostos apresentam atividade, posteriormente será realizada a diluição seriada. Em cada placa de teste haverá poços controles constituídos por hemácias infectadas (controle positivo) em meio de cultivo sem adição de compostos. A cloroquina será utilizada em cada experimento como composto padrão.

Após 48 horas de incubação em dissecadores a 37 °C, com troca completa diária de meio, serão confeccionados esfregaços correspondentes a cada poço. Depois de fixados com metanol e corados com Giemsa, os esfregaços serão utilizados para proceder à contagem da parasitemia ao microscópio óptico (1000x). A atividade dos compostos será expressa pela porcentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem fármacos, que será considerada como 100% de crescimento do parasito. Os experimentos serão realizados em triplicatas e a leitura através de lâminas codificadas. A metade da concentração máxima inibitória ( $IC_{50}$ ) será determinada.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A curcumina é um polifenol natural presente no rizoma da *Curcuma longa Linnaeus* (SUN, 2013; MARATHE, 2013). Esta possui efeitos citotóxico e antiparasitário demonstrados em culturas contra *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Giardia* e *Plasmodium falciparum* (CUI, 2007; MANOHAR, 2013). Gomes e colaboradores destacam que derivados de curcumina são potenciais alvos contra a malária (GOMES et al. 2014).

A quinina é uma substância natural retirada da casca da *Cinchona calisaya*. Consiste em um fármaco que atua como um esquizonticida sanguíneo contra as formas de *Plasmodium*. A utilização da quinina é limitada pela sua toxicidade, sendo utilizada para o tratamento de doença grave causada por cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e outros fármacos (FRANÇA, 2008).

Os sistemas nanoparticulados têm a capacidade de melhorar características dos fármacos, tais como a biodisponibilidade e a solubilidade. Além disso, oferecem soluções para problemas de liberação de fármacos, pois proporcionam uma liberação contínua e controlada do fármaco encapsulado no alvo, diminuindo os efeitos colaterais e melhorando a eficiência (CABAN et al., 2014). Diante disso, os compostos foram testados, utilizou-se como controles a cloroquina e o artemeter (antimaláricos padrão), bem como nanocápsulas brancas (NC1-BR, NC2-BR, NC3-BR, NC4-BR, F1-NC BR, F2- NC BR PEG, F5 - NC BR EUDRAGIT)

O efeito antimalárico dos compostos foi avaliado utilizando método tradicional contra as cepas W2 *P. falciparum* (cloroquina resistente) (Tabela 1). A metade da concentração máxima inibitória ( $IC_{50}$ ) foram determinados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados utilizando o software OriginPro8.0. Os compostos quinina e curcumina foram ativos para as cepas W2 (cloroquina resistente), estes dados confirmam a atividade destes compostos.

Os ensaios de citotoxicidade permitiram analisar a taxa de sobrevivência da linhagem celular na presença dos compostos. O que identifica se o composto foi tóxico ou não a linhagem celular utilizada. Para tanto a concentração que provoca a morte de 50% ( $IC_{50}$ ) foi verificada. Os compostos não apresentaram

atividade citotóxica conforme tabela 1. Além disso, obteve-se o índice de seletividade (IS), que corresponde à relação entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada composto, sendo possível identificar valores de IS adequados aos compostos testados (Tabela 1).

**Tabela 1: Resultados *in vitro* para a atividade antimalária (IC<sub>50</sub>) dos compostos contra a cepa W2 de *P. falciparum*, IC<sub>50</sub> na linhagem celular humana WI-26-VA-4 e índice de seletividade.**

Compostos	IC <sub>50</sub> (µM) <i>P. falciparum</i>	Atividade Antimalária	IC <sub>50</sub> (µM) WI-26-VA4	IS
	± DP		± DP	
1	>10	Inativo	>100	>100
2	>10	Inativo	>100	>100
3	>10	Inativo	>100	>100
4	>10	Inativo	>100	>100
5	0,25 ± 0,08	Ativo	45 ± 0,06	>100
6	0,31 ± 0,01	Ativo	39 ± 0,05	>100
7	0,23 ± 0,06	Ativo	42 ± 0,07	>100
8	0,17 ± 0,03	Ativo	25 ± 0,09	>100
Cloroquina	0,80 ± 0,14	Ativo	>100	>100
Artemeter	0,15 ± 0,09	Ativo	>100	>100

As nanocápsulas mostraram atividade, conforme já demonstrado na tabela 1. Estes dados sugerem a importância do nanoencapsulamento para melhorar a atividade de compostos.

## CONCLUSÕES

Os compostos são promissores. Os valores elevados de  $IC_{50}$  para linhagem celular demonstram a baixa ação citotóxica destes compostos, indicando que a síntese é um caminho para a obtenção de fármacos com baixa citotoxicidade e seletivos contra as espécies de *Plasmodium*.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C. C. et al.. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 107: 831-845, 2012

CABAN, S. A. E.; SAHIN, A.; CAPAN, Y. Nanosystems for drug delivery. **Drug Delivery**, v. 2(1), p. 2 – 7, 2014.

CARMICHAEL J., DEGRAFF W.G., GAZDAR A.F., MINNA J.D., MITCHELL J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radio sensitivity. **Cancer Research**, 15-47(4), 943-6, 1987.

CAUCHETIER, E., FESSI, H., BOULARD, Y., DENIAU, M., ASTIER, A., PAUL, M. Preparation and Physicochemical Characterization of Atovaquone-Containing Liposomes. **Drug Development Research**, v.47, p. 155–161, 1999.

HANSSON, A. G.; MITCHELL, S.; JATLOW, P.; RAINY, P. M. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for atovaquone. **Journal of Chromatography B**, v.675, p.180182, 1996.

KATSUNO, K. , BURROWS, J.N. , DUNCAN, K. , HUIJSDUIJNEN, R.H. , KANEKO, T. , KITA, K. , MOW- BRAY, C.E. , SCHMATZ, D. , WARNER, P. , SLINGSBY, B.T. . *Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world*. **Nature Rev. Drug Discov.** 14, 751–758, 2015.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P.. Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages In Culture. **Journal Of Parasitology**, v.65, p. 418-420, 1979.

LEITE, F. H. A. et al. Docking between natural peroxides and heme group by parametric method 6. **International Journal of Quantum Chemistry** 112(20): 3390-3397. 2012.

MICHELS, L. R. Desenvolvimento, caracterização, avaliação da eficácia in vitro, in vivo e farmacocinética de nanopartículas de nanopartículas de superfície modificada contendo quinina. **Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)** – UNIPAMPA. Uruguaiana, p.28. 2016.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat Med** 19(2): 156-167, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias. **Série B: textos básicos de saúde**, 8<sup>a</sup> ed., p. 296-312, 2010.

NEVES, D. P. et al.. Parasitologia Humana. **Editora Atheneu**, 11<sup>a</sup> ed, p.143-160, 2005.

NEWMAN, R. D. Malaria control beyond. **BMJ**, v. 340, p. 2714, 2010.

PARK J.G., et al.. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay, **Cancer Res.**, 15- 47(22), 5875-9, 1987.

RANG, H.P. et al.. Farmacologia In: Fármacos antiprotozoários. 6<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 698-711, 2008.

ROLAN, P. E. et al.. Examination of some factors responsible for a food induced increase in absorption of atovaquone. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.37, p.13-20, 1994.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B.. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v.193, p. 673-675, 1976.

VAROTTI, F.P et al.. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and

Artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52(11): 3868-3874, 2008.

WHO .**Word Malaria Report**. p. 186, 2022.

WHO. **World Malaria Report**. 2011.

## **FOMENTO**

Anima, UNA