

ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE TERPENOS OBTIDOS DO GÊNERO COPAIFERA SOBRE O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

De Pieri, F.A.

Resumo

Resenha do artigo “Terpenes from Copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity” de Erika Izumi, Tania Ueda-Nakamura, Valdir F. Veiga, Jr, Angelo C. Pinto, e Celso Vataru Nakamura publicado no Journal of Medicinal Chemistry, e entrevista com dois dos autores.

palavras-chave: Copaifera; terpenos; antiparasítico; sinergismo; T. cruzi; doença de Chagas

SYNERGISTIC ACTIVITY BETWEEN TERPENES FROM COPAIFERA GENUS AGAINST THE ETIOLOGICAL AGENT OF CHAGAS DISEASE

Abstract

A review of the article “Terpenes from Copaifera demonstrated in vitro and antiparasitic synergic activity” published in the Journal of Medicinal Chemistry, written by the authors Erika Izumi, Tania Ueda-Nakamura, F. Valdir Veiga, Jr., Angelo C. Pinto, and Celso Nakamura Vataru, followed by an interview with two authors of this article are presented.

Keywords: Copaifera; terpenes; antiparasitic; synergism; T. cruzi; Chagas disease

*(Endereço Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Terezina, 476. Adrianópolis. Manaus - AM. CEP: 69.057-070, Brasil)

E-mail para correspondência: pierifabio@hotmail.com

ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE TERPENOS OBTIDOS DO GÊNERO COPAIFERA SOBRE AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Fábio A. Pieri^{a*}

^aInstituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Terezina, 476. Adrianópolis. Manaus - AM.

CEP: 69.057-070, Brasil

*pierifabio@hotmail.com

Diversos trabalhos têm buscado a obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais para o tratamento de diversas enfermidades, e em especial à Doença de Chagas.^{1,2,3,4} Esta afecção é endêmica na América Latina acometendo milhões de pessoas, e possui como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*.⁵

O tratamento da doença de Chagas é feito com drogas que possuem alta toxicidade ao organismo do hospedeiro, ou que tem eficácia baixa contra o patógeno.⁶ Estudos apontam para a possibilidade da utilização de compostos obtidos de produtos naturais em sinergismo com algumas drogas existentes para o combate ao agente etiológico, entretanto o trabalho realizado pelos pesquisadores no artigo que é objeto desta resenha mostra resultados consistentes do que vem a ser o primeiro relato de sinergismo entre dois terpenos obtidos da mesma planta, sobre *T. cruzi*. O delineamento criterioso do trabalho e a metodologia empregada dão base a esta consistência.

O grupo da Universidade Estadual de Londrina com os professores Celso Nakamura e Tânia Ueda-Nakamura (Universidade Estadual de Maringá), a pós-doutoranda Erika Izumi, em colaboração com os professores Valdir Veiga Junior (Universidade Federal do Amazonas) e Angelo C. Pinto (Universidade Federal do Rio de Janeiro), avaliaram a bioatividade de sete diterpenos (copalato de metila, ácido copálico, ácido 3β-hidróxi-copálico, ácido

agático, ácido pinifólico, ácido poliáltico e ácido caurenóico), provenientes da fração resinosa de óleos de Copaifera, e um sesquiterpeno (β -cariofileno) que é encontrado na maioria dos óleos de espécies deste gênero,⁷ sobre diferentes fases do ciclo do parasita *T. cruzi*.

Os resultados apontaram os terpenos com atividade inibitória sobre as fases do ciclo do parasita avaliadas, diferindo entre si pela concentração ativa da DL_{50} de cada composto. (concentração inibitória para eliminação de 50% dos parasitas). Nestes ensaios, destacaram-se os diterpenos ácido copálico, 3β -hidróxi-copálico e o sesquiterpeno β -cariofileno, os quais foram avaliados quanto ao possível sinergismo de suas atividades sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Esta avaliação apontou resultados muito satisfatórios na interação do ácido copálico e o β -cariofileno, com redução da DL_{50} na ordem de 25 e 11 vezes para os compostos, respectivamente. Os autores ainda sugeriram que a diferença de sinergismo entre os ácidos, com relação ao sesquiterpeno, teria acontecido pela ausência da hidroxila no ácido copálico. Aparentemente esta hidroxila, presente no ácido 3β -hidróxi-copálico teria ação negativa sobre este sinergismo.⁶

Sabendo que os terpenos têm atividade sobre as diversas fases do ciclo do parasita, e que o β -cariofileno e o ácido copálico em sinergismo podem ser empregados em doses muito menores, com grande eficiência, quais seriam os mecanismos que estes compostos usariam para eliminá-lo?

Complementando o estudo da bioatividade dos compostos, foi feita a análise de peroxidação de lípideos, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão, nas formas epimastigotas tratadas, para verificar as alterações causadas pelos terpenos no equilíbrio redox, integridades celular e mitocondrial e na microestrutura do parasita, respectivamente. Houve aumento no estresse oxidativo do parasita, causado por apenas dois dos terpenos: o ácido copálico e o β -cariofileno. Outros mecanismos de ação foram identificados:

Pelos achados da citometria de fluxo, com exceção do copalato de metila e do ácido pinifólico, todos

os demais terpenos testados afetaram a integridade da membrana celular; o sesquiterpeno do estudo causou forte alteração do potencial mitocondrial, e essa foi parcial para o ácido copálico e o ácido 3β -hidróxi-copálico

A microscopia de transmissão evidenciou alterações celulares das formas epimastigotas submetidas à DL_{50} dos terpenos. O β -cariofileno produziu total desorganização do cinetoplasto e formação de vacúolos membranosos concêntricos. A ultraestrutura foi modificada pelos diterpenos: o ácido copálico causou um inchaço mitocondrial pronunciado; já o ácido 3β -hidróxi-copálico causou a formação de vacúolos membranosos em todo o organismo do parasita, indicando um possível processo de autofagia, e ainda provocou desorganização das organelas celulares.

Os achados de aumento das mitocôndrias e cinetoplastos observados por microscopia eletrônica, após os tratamentos com os ácidos copálico e o β -cariofileno, puderam explicar a lipoperoxidação e a perda do marcador catiônico utilizado para verificar o potencial da membrana das mitocôndrias.

Tendo os pesquisadores descoberto, neste momento, o potencial de ação dos terpenos sobre *T. cruzi*, o sinergismo entre eles e também como estes compostos agem nas células do parasita, outra pergunta surgiu: E sobre o organismo do hospedeiro, não pode haver ação deletéria?

Para responder esta questão, os pesquisadores avaliaram a atividade citotóxica das substâncias sobre células de mamíferos LLCMK2 e eritrócitos. Quanto ao potencial hemolítico, foi identificada baixa toxicidade da maioria dos terpenos, com 50% de hemólise apenas para concentrações acima de 400 μ M. O ácido pinifólico foi o menos hemolítico, causando apenas 8% de hemólise em concentrações acima de 1500 μ M. O ácido copálico e o 3β -hidróxi-copálico foram os mais agressivos aos eritrócitos, causando lise em 50% em doses inferiores a 200 μ M.

Com relação à toxicidade sobre células nucleadas, os terpenos foram considerados moderadamente tóxicos. Destaque para o baixíssimo potencial do β -cariofileno sobre estas células, com DL_{50} acima

de 1700 μM , enquanto para o ácido copálico e o 3 β -hidróxi-copálico, a DL_{50} foi de 39,1 e 31,2 μM , respectivamente.

Deve-se ressaltar que o ensaio de sinergismo apontou reduções drásticas nas DL_{50} dos compostos sobre *T. cruzi*. Desta maneira, as doses de β -cariofileno e de ácido copálico necessárias para matar o parasita são muito inferiores às necessárias para causar danos relevantes no organismo hospedeiro, indicando assim a possibilidade do uso seguro destes terpenos no tratamento da Doença de Chagas.

Apesar de alguns estudos terem apresentado ensaios com atividade de combinações de extratos vegetais com atividade sinérgica sobre parasitas⁸, e da interação de fitoquímicos e antiparasitários convencionais sobre o agente etiológico desta doença,^{3,4,9} o trabalho do grupo brasileiro foi o primeiro a apresentar a interação sinérgica entre dois compostos bioativos naturais obtidos da mesma planta.

Ainda, deve ser ressaltado que o ácido copálico e o β -cariofileno são componentes comuns a todos os óleos de copaíba caracterizados até o momento,⁷ sugerindo que a bioatividade dos óleos de copaíba sobre *T. cruzi* se deva a este sinergismo. Isto também revela que possivelmente quase todos (ou todos) os óleos provenientes das árvores do gênero *Copaifera* tenham atividade sobre este parasita.

Desta forma, pode se concluir que estes achados apresentados no artigo são de grande importância para fornecer alternativas às drogas atuais empregadas à Doença de Chagas, com efeitos menos tóxicos e com maior eficiência no combate ao parasita.

Referências Bibliográficas

¹ Campos, M. C. O.; Salomao, K.; Castro-Pinto, D. B.; Leon, L. L.; Barbosa, H. S.; Maciel, M. A.; Castro, S. L. *Parasitol. Res.* 2010, 107, 1193.

² Menna-Barreto, R. F. S.; Laranja, G. A. T.; Silva, M. C. C.; Coelho, M. G.; Paes, M. C.; Oliveira, M. M.; Castro, S. L. *Parasitol. Res.* 2008, 103, 111.

³ Pelizzaro-Rocha, K. J.; Tiunan, T. S.; Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Nakamura, C. V. *Phytomedicine* 2010, 18, 36.

⁴ Sülsen, V.; Barrera, P.; Muschietti, L.; Martino, V.; Sosa, M. *Molecules* 2010, 15, 545.

⁵ WHO. *Reporte Sobre la Enfermedad de Chagas*; WHO: Geneva, Switzerland, 2007;

⁶ Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga-Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V.J. *Med. Chem.* 2012, 55, 2994.

⁷ Leandro, L.M.; Vargas, F.S.; Barbosa, P.C.S.; Neves, J.K.O.; Silva, J.A.; Veiga Jr, V.F. *Molecules* 2012, 17, 3866.

⁸ Gathirwa, J. W.; Rukunga, G. M.; Mwitari, P. G.; Mwikwabe, N. M.; Kimani, C. W.; Muthaura, C. N.; Kiboi, D. M.; Nyangacha, R. M.; Omar, S. A. J. *Ethnopharmacol.* 2011, 134, 434.

⁹ Fieck, A.; Hurwitz, I.; Kang, A. S.; Durvasula, R. *Exp. Parasitol.* 2010, 125, 342.

Entrevista com o Professor Celso Vataru Nakamura

Fabio: Quantos alunos compõem seu grupo de pesquisa?

Celso: O nosso grupo de pesquisa “Atividade Biológica de Produtos Naturais” é constituído por cinco doutorandos, oito mestrados e 11 alunos de iniciação científica. Além dos nossos orientados temos também a participação de três pesquisadores (Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho e Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager) juntamente com seus orientandos.

Fabio: Quais as linhas de pesquisa que seu laboratório desenvolve atualmente?

Celso: Atividade antiprotozoário, antibacteriana e antifúngica de substâncias naturais e sintéticas, além de atividade antioxidante e antienvelhecimento de produtos naturais aplicados à cosmetologia.

Fábio: Quando passou a se interessar pelo estudo de princípios bioativos de produtos naturais?

Celso: Iniciamos nossos trabalhos nessa linha de pesquisa em 1994. No entanto os resultados começaram a ser obtidos após a implantação do pro-

grama de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Maringá em 2000.

Fábio: Qual sua opinião a cerca da futura importância dos achados deste artigo?

Celso: Os resultados obtidos comprovam que a atividade biológica de um produto utilizado popularmente não está restrito a uma substância específica. A comprovação científica do uso popular deve ser verificada nos extratos, frações, substâncias isoladas, e também nas ações sinérgicas dos componentes presentes naquela determinada planta utilizada.

Fábio: Seria possível e viável obter produtos sintéticos derivados destes compostos com atuação sinérgica?

Celso: Se os pesquisadores na área de Química conseguirem sintetizar os compostos em grande quantidade, principalmente os compostos 2 e 8 (ácido copálico e β -cariofileno), poderíamos realizar um belo trabalho, seja realizando os estudos in vivo dessa associação, ou desenvolver formulas farmacêuticas, aplicar tecnologias para obtenção de nanofármacos entre essas substâncias sinérgicas.

Fábio: O delineamento do trabalho foi muito interessante. Mesmo assim, você acha que mais algum ensaio poderia ter sido incluído para consolidar ainda mais a conclusão do estudo?

Celso: Sim. Poderíamos ter realizados experimentos para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação do óleo da copaíba na morte do parasita, como a caracterização dos autofagossomos, na regulação osmótica ou mesmo o estresse oxidativo. Outros estudos poderiam ser feitos através das modificações nas moléculas das substâncias isoladas, verificando o efeito estrutura-atividade.

Fábio: Quais os próximos passos para o desenvolvimento desta alternativa no tratamento da doença de Chagas?

Celso: Realizar os estudos in vivo, avaliando a eficácia das substâncias associadas na infecção experimental utilizando amostras de *Trypanosoma cruzi* de diferentes linhagens (sensíveis e resistentes

ao benzonidazol), a genotoxicidade bem como a citotoxicidade aguda e crônica.

Entrevista com o Professor Valdir Florêncio da Veiga Junior

Fábio: Quantos alunos compõem seu grupo de pesquisa?

Valdir: Nosso grupo vêm crescendo continuamente desde sua origem, em 2005. Hoje há um total de 27 pesquisadores: 14 estudantes de pós-graduação, além de dois pós-doutorandos, sete alunos de iniciação científica e quatro graduados e mestres com bolsas de pesquisa. Além destes, há outros pesquisadores doutores (que possuem orientados trabalhando em colaboração com nosso grupo) que integram o Q-BiomA.

Fábio: Além da análise química das *Copaifera*, quais os outros produtos naturais o seu grupo tem pesquisado atualmente?

Valdir: O grupo estuda principalmente as espécies das famílias Leguminosae (a que pertence o gênero *Copaifera*), Burseraceae (em especial óleos essenciais, resinas e lignanas) e Lauraceae (óleos essenciais e alcaloides), e esponjas dulcícolas e resíduos de frutos da Amazônia.

Fábio: Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o professor Celso-Nakamura e o Professor Angelo Pinto. Quais outras parcerias o seu laboratório tem estabelecidas atualmente?

Valdir: Há diversas parcerias com empresas, universidades e instituições de pesquisas, como a Embrapa, o INPA e a Fiocruz. Temos como foco o fortalecimento das colaborações com pesquisadores da Amazônia, mas estamos sempre abertos às parcerias, especialmente com pesquisadores experientes e de instituições de excelência, como são os professores Celso e Angelo.

Fábio: Quais as dificuldades que o seu laboratório tem encontrado nos últimos anos para desenvolver suas pesquisas?

Valdir: As dificuldades estruturais de instituições de pesquisa e ensino federais são bem conhecidas. Na Universidade Federal do Amazonas não é diferente, muito pelo contrário, passamos muitas décadas sem investimento. Entretanto, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e o CNPq tem contribuído enormemente para a melhoria da infraestrutura dos nossos laboratórios.

Fábio: No artigo, vocês se referem à possível habilitação do ácido copálico ao sinergismo com o β -cariofileno por causa da ausência da hidroxila em sua estrutura, diferente do ácido 3β -hidróxi-copálico: Como isto poderia ter interferido?

Valdir: A influência da hidroxila na posição 3 de decalinas na atividade biológica é bastante descrita e bem conhecida, como nos casos de triterpenos e esteróis. É interessante observar que no caso destes diterpenos esta hidroxila influencia de forma negativa a bioatividade.

Fábio: Seria possível e viável obter produtos sintéticos derivados destes compostos com atuação sinérgica?

Valdir: O cariofileno é obtido em grande quantidade de fontes naturais, como o óleo de cravo. Já o ácido copálico, só está presente nos óleos de copaíba e em outras oleoresinas, como na de jatobá. Sua síntese é possível e viável, mas transformações químicas a partir do produto natural são economicamente mais interessantes.

