

SARA GUIBUNDA TAJÚ

**Isolamento de compostos com atividade esquistossomicida  
presentes na macroalga marinha *Ochtodes secundiramea*  
(Montagne) Howe (Rhodophyta, Gigartinales)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Nakano

Coorientadora: Profa. Dra. Erika Mattos Stein

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2019

## RESUMO

TAJÚ, S.G. **Isolamento de compostos com atividade esquistossomicida presentes na macroalga marinha *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta)**. 109 folhas. Tese (Doutorado em Pós Graduação em Interunidades em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta quase 240 milhões de pessoas no mundo. O praziquantel (PZQ) é o único fármaco recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e disponível atualmente para o seu tratamento e controle. É um medicamento eficaz, contra o qual ainda não foi comprovado qualquer tipo de resistência, mas há estudos que mostram a resistência do parasita em laboratório. A OMS reconhece a necessidade da busca de terapias alternativas para o tratamento e controle da esquistossomose. A escolha das algas marinhas como fonte de compostos bioativos se deve ao fato das algas habitarem um ambiente competitivo e produzirem compostos que permitem a sua adaptação e defesa química contra predadores. Esses compostos podem ter outras funções fora do ambiente marinho. Essas outras funções incluem atividades biológicas relevantes como já foi comprovado por vários pesquisadores. Em nosso grupo de pesquisa já tinha sido identificada a atividade esquistossomicida em extratos e compostos isolados (terpenos) dos gêneros de algas *Laurencia* e *Dictyota*. Sendo assim, foi realizada a triagem de extratos de 36 espécies de algas marinhas em face de atividade esquistossomicida, tendo se identificado três espécies ativas: *Laurencia dendroidea*, *Porphyra spiralis* e *Ochtodes secundiramea*. Foi feito um fracionamento biomonitorado com os extratos dessas espécies e, três frações de *O. secundiramea* mataram 100% dos parasitas em 24 e 48 horas de exposição. O fracionamento resultou no isolamento e caracterização de três monoterpenos halogenados análogos: octodeno **1**: 4-bromo-1,6,8-tricloro-2-3- octodeno ( $C_{10}H_{14}BrCl_3$ ), octodeno **2**: 2-cloro-1,6,8-tribromo-3-8-octodeno ( $C_{10}H_{14}Br_3Cl$ ) e octodeno **3**: 1-cloro-5,7-dibromo-2-3-octodeno ( $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ ), novo para a literatura. *O. secundiramea* é conhecida por produzir monoterpenos halogenados com atividades biológicas como antiparasitárias e fungicidas. Os três compostos isolados foram avaliados quanto à atividade

esquistossomicida e os octodenos **2** e **3** foram inativos. O octodeno **1** é o composto responsável pela atividade com a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) 49,19 µM (15,70 µg/mL) em machos e 53,25 µM (16,98 µg/mL) em fêmeas de *S. mansoni*. O composto **1** mostrou baixa citotoxicidade em células normais de mamíferos, com o IC<sub>50</sub> de 450 µM em 24 horas de incubação. Com esses resultados e observando as estruturas das três moléculas podemos inferir que a atividade esquistossomicida do octodeno **1** está relacionada à maior presença dos cloros na molécula em relação aos bromos; a posição da ligação dupla bem próxima a dois cloros e um bromo, criando uma ressonância naquela região e aumentando a reatividade e possibilidade de interação com o receptor. Embora o alvo molecular dos fármacos esquistossomicidas seja desconhecido, os resultados do presente estudo contribuem para a compreensão das relações estrutura/atividade. Pela atividade demonstrada em *S. mansoni* e a baixa citotoxicidade, o composto 4-bromo-1,6,8-tricloro-2-3-octodeno (**1**) pode ser considerado um candidato a fármaco para o tratamento da esquistossomose.

**Palavras chaves:** *Helmintíase; Esquistossomose; Macroalgas; Ochtodes secundiramea; Octodeno.*

## ABSTRACT

TAJÚ, S.G. **Isolation of schistosomicidal compounds from the marine seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta)**. 109p. Thesis (PhD). (Doutorado em Pós Graduação em Interunidades em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Schistosomiasis is a parasitic disease affecting almost 240 million people worldwide. Praziquantel (PZQ) is the only drug recommended by World Health Organization (WHO) for schistosomiasis treatment and control. PZQ is efficient and there is no evidence of induced resistance, but reduced susceptibility to the drug was related in laboratory studies. WHO recognizes that searching for alternative drugs is needed. The choice of marine algae as a source of bioactive compounds is due to the fact that algae inhabit a competitive environment and produce compounds that allow their adaptation and chemical defense against predators. These compounds may have other functions outside the marine environment. These other functions include relevant biological activities as has been proven by several researchers. In our research group the schistosomicidal activity in extracts and isolated compounds (terpenes) of the *Laurencia* and *Dictyota* algae genera had already been identified. In this study, a screening of 36 species of seaweed for schistosomicidal compounds was performed. Three active species were identified: *Laurencia dendroidea*, *Porphyra spiralis* and *Ochtodes secundiramea*. A biomonitoring fractionation was done with the extracts of these species and three fractions of *O. secundiramea* killed 100% of the parasites in 24 and 48 hours of exposure. Fractionation resulted in the isolation and characterization of three halogenated monoterpenes analogues: octodene **1**: 4-bromo-1,6,8-trichloro-2-3-octodene ( $C_{10}H_{14}BrCl_3$ ), octodene **2**: 2-chloro-1,6,8-tribromo-3-8-octodene ( $C_{10}H_{14}Br_3Cl$ ) and octodene **3**: 1-chloro- 5,7-dibromo-2-3-octodene ( $C_{10}H_{15}Br_2Cl$ ), new to the literature. *O. secundiramea* is known by producing halogenated monoterpenes with biological activities such as antiparasitic and fungicidal. The three compounds isolated were evaluated for schistosomicidal activity and octodenes **2** and **3** were inactive. Octodene **1** is the compound responsible for the schistosomicidal activity. The median inhibition concentration values ( $IC_{50}$ ) were determined for male (49,19  $\mu M$ ;

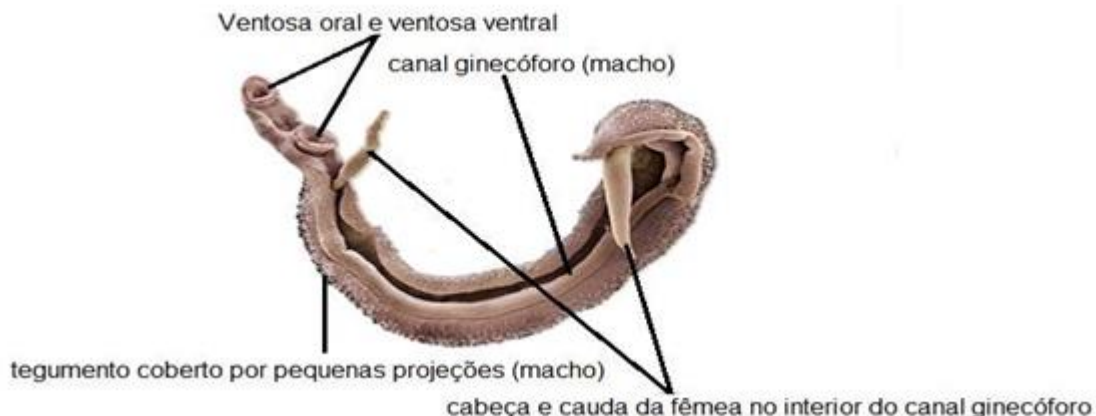
15,70 µg/mL) and female worms (53,25 µM; 16,98 µg/mL). The compound **1** showed low cytotoxicity in mammalian cells (IC<sub>50</sub> = 450 µM after 24 hours of incubation). The schistosomicidal activity of ochtodene **1** may be related to the presence of more chlorine atoms in the molecules compared to bromide atoms. The position of the double bond, close to two chlorine and one bromine atoms creates a resonance, increasing the reactivity and possibility of interaction with the receptor. Although the molecular target for schistosomicidal drugs is unknown, the data obtained in the present study contribute to understand the structure/activity relationships. The compound 4-bromo-1,6,8-trichloro-2-3- ochtodene (**1**) can be considered a good drug candidate to the treatment of schistosomiasis as it showed activity in *S. mansoni* with low cytotoxicity.

**Keywords:** helminthiasis; schistosomiasis; macroalgae; *Ochtodes secundiramea*; *ochtodene*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A esquistossomose (também chamada bilharziose ou esquistossomíase) é uma doença parasitária que afeta mais de 240 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2017). A doença é causada por parasitas da classe Trematoda e gênero *Schistosoma*, cujos indivíduos se caracterizam por apresentarem o corpo achatado dorsoventralmente, cor branco-acinzentado e tamanho de 1,0 a 1,5 cm de comprimento. Tem ventosas, tegumento complexo, sistema digestivo cego e não tem sistemas definidos. Uma característica evolutiva deste gênero é o dimorfismo sexual. O macho apresenta o canal ginecóforo que envolve a fêmea durante a cópula. Os parasitas permanecem acasalados a maior parte do tempo (NEVES et al., 2005; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012) (Figura 1).

**Figura 1** - Parasitas adultos de *S. mansoni* acasalados; a fêmea no interior do canal ginecóforo (adaptado de MAGILL, et al., 2012).

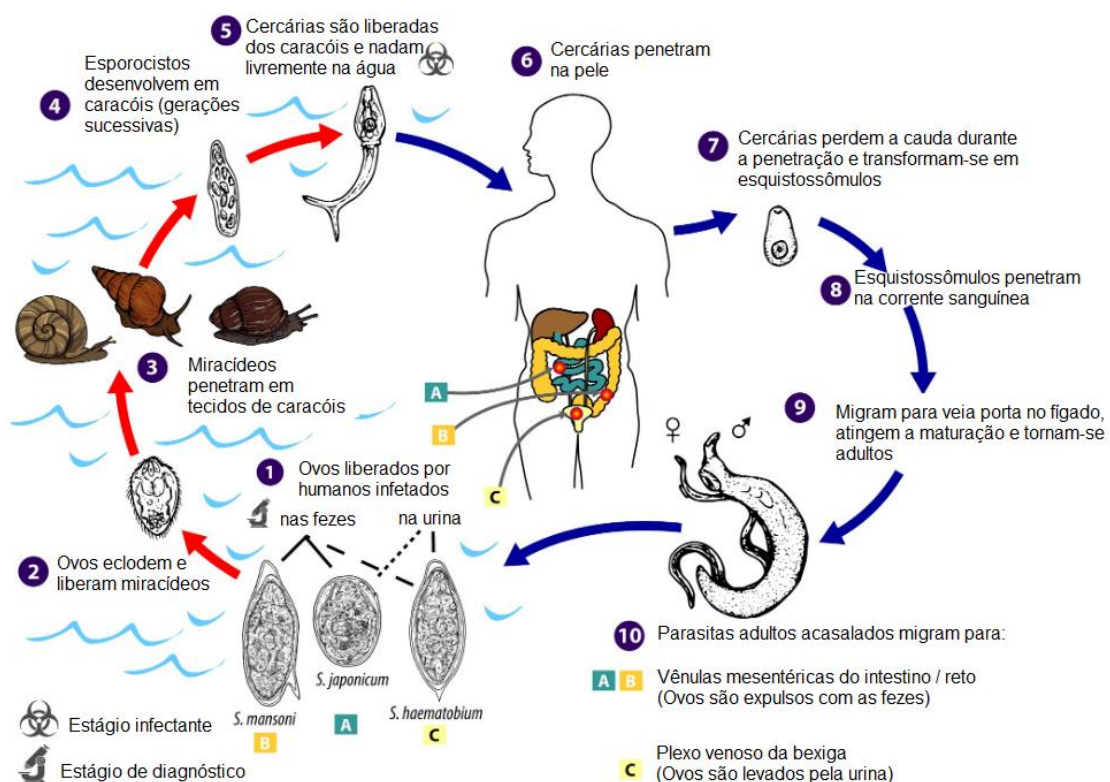


O ciclo de vida do *Schistosoma* ocorre em duas fases: a fase sexuada, que pode ser no homem ou noutro vertebrado; e a fase assexuada, em moluscos dos gêneros *Biomphalaria* (Preston, 1910), *Bulinus* (O.F. Müller, 1781) ou *Oncomelania* (Gredler, 1881) (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012) (Figura 2).

Durante a cópula, a fêmea coloca centenas de ovos, e parte deles é eliminada com as fezes ou com a urina. Ao entrarem em contato com a água, liberam a larva chamada miracídio, que nada à procura de um hospedeiro intermediário adequado. Ao penetrar no molusco, sofre sucessivas divisões mitóticas, originando esporocistos primários, esporocistos secundários e, por fim,

diferencia-se em larvas denominadas cercárias (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012). As cercárias saem do molusco em centenas sob o estímulo da luz e nadam ativamente em direção ao hospedeiro definitivo. Quando o encontram, penetram na derme e perdem a cauda. Transformam-se em esquistossômulos, que atingem a corrente sanguínea ou sistema linfático, passam pelo coração, pulmões e entram no fígado e veia porta. Quando adultos, os parasitas acasalam-se e migram para as veias mesentéricas do intestino ou para o plexo venoso da bexiga, onde as fêmeas colocam os ovos. Desses, cerca de um terço é eliminado do organismo com as fezes ou com a urina. A outra parte fica presa nos tecidos, levando à patologia (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012).

**Figura 2** - Ciclo de vida das espécies de *Schistosoma* (modificado de CDC, 2019).



Das seis espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, três, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, são de importância global (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; MAGILL et al., 2012) e causam patologias diferentes. *S. mansoni* tem como hospedeiro intermediário o molusco do gênero

*Biomphalaria* e causa a esquistossomose intestinal e hepatoesplênica; *S. japonicum* tem como hospedeiro intermediário o molusco do gênero *Oncomelania*, e causa a esquistossomose hepatoesplênica e *S. haematobium*, que tem como hospedeiro intermediário o molusco do gênero *Bulinus* e causa a esquistossomose urinária (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; MAGILL et al., 2012).

A esquistossomose é frequente em países de regiões tropicais e subtropicais da África, América do Sul e Ásia (FENWICK et al., 2003; EL-BESHBISHI et al., 2015; WHO, 2015). No entanto, na África prevalece a ocorrência de mais de 92% dos casos (WHO, 2016) (Figura 3).

**Figura 3** - Situação da esquistossomose no mundo (Adaptado de WHO, 2016).



Na África, estão presentes os três gêneros de moluscos, *Bulinus*, *Oncomelania* e *Biomphalaria*, causando a esquistossomose: intestinal e urinária. Em muitos países, ocorre a infecção pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* simultaneamente, causando a esquistossomose hepatointestinal e urinária (WHO, 2015). Em alguns países da Ásia (China, Indonésia e Filipinas) ocorre a esquistossomose intestinal e, em outros (Irã, Iraque e Síria), a esquistossomose urinária (WHO, 2015). Nas Américas, o gênero

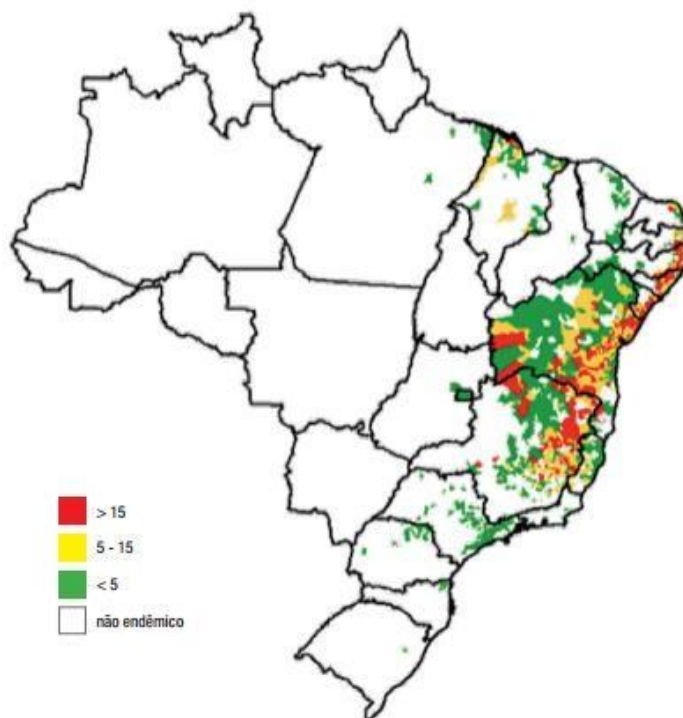


*Biomphalaria* é o único hospedeiro intermediário e o *S. mansoni* é a única espécie presente (WHO, 2015; BARBOSA et al., 2006).

No Brasil a esquistossomose é considerada um problema de saúde pública, pois dos 207 milhões de habitantes 1,5 milhão precisa de Quimioterapia Preventiva (QP) (WHO, 2016) (Figura 3). O *S. mansoni* foi descoberto pelo pesquisador brasileiro Manoel Augusto Pirajá da Silva, em 1908 na Bahia (NEVES et al., 2005). A doença chegou ao país por meio de tráficos de escravos oriundos da África (KATZ, 2018).

A esquistossomose se encontra nas seguintes unidades federadas: Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Ceará, Piauí, Maranhão, Pará, Goiás, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal (KATZ, 2018) (Figura 4).

**Figura 4** - Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil, segundo o percentual de positividade de 1998 a 2008 (KATZ, 2018).



No Brasil, três espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) atuam como hospedeiros intermediários de *S. mansoni*. São elas a *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY, 1835) e *Biomphalaria straminea* (DUNKER, 1848).

Não existe uma sintomatologia muito clara para a esquistossomose,

dificultando o seu diagnóstico e possibilitando confusão com outras doenças. E, não obstante, a esquistossomose pode se apresentar assintomática. Mesmo quando apresenta sintomas, esses variam de indivíduo para indivíduo, tendo em conta vários fatores como contato permanente com áreas endêmicas, resposta imunológica, fatores genéticos, entre outros. Muitos autores classificam em patologia aguda e patologia crônica de forma a tentar explicar os sintomas observados desde a penetração da cercária até a eliminação dos ovos (DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008).

A patologia aguda resulta da migração e amadurecimento do esquistossômulo e manifesta-se como uma reação hipersensitiva sistêmica. O paciente pode apresentar sintomas de gripe, febre prolongada, fadiga, dores musculares, dores de cabeça e tosse seca. Nessa fase, a doença ainda não é detectada por exames de fezes ou urina, mas por testes sorológicos associados ao histórico de contato com águas tropicais (MAGILL et al., 2012).

A patologia crônica é resultado de anos de infecção e a presença de ovos presos nos tecidos em volta do intestino, no fígado, baço, ou bexiga causando reações imunogranulomatosas, caracterizada por infiltrações eosinofílicas em volta do ovo devido às enzimas secretadas por ele próprio, que ajudam na sua penetração nos tecidos. Essas reações imunogranulomatosas protegem o hospedeiro humano de moléculas e corpos estranhos, contudo, se forem numerosas e incontroláveis desencadeiam uma patologia grave (GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012).

Os sintomas da esquistossomose são determinados pela localização dos parasitas e ovos, e o que causa a morbidade é a intensidade da infecção e a resposta imune individual. A patologia crônica pode ocorrer na esquistossomose intestinal e hepatoesplênica e a esquistossomose urinária pode evoluir para câncer de bexiga (GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; MAGILL et al., 2012).

O controle da endemia é feito por meio de quimioterapia preventiva (QP), uso de moluscidas e saneamento básico. O praziquantel (PZQ), o único fármaco disponível atualmente para tratamento e controle da esquistossomose, é eficaz contra todas as espécies na fase adulta do parasita e administrado em dose única e oral (NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; MAGILL et al., 2012). Usado na QP, o PZQ é administrado em massa em áreas de risco e tem

como objetivo diminuir a morbidade da doença.

O controle da esquistossomose por meio de moluscidas em termos logísticos é um processo caro, complexo e tóxico para outras espécies. Não obstante, o número de caramujos pode até ser reduzido, mas esses dificilmente serão eliminados completamente. A niclosamida é único moluscida disponível recomendado pela OMS, contudo está sendo proibida a sua aplicação devido a alta toxicidade (FENWICK et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; MAGILL et al., 2012).

A OMS recomenda tratar toda a população com o PZQ nas áreas endêmicas independentemente do seu estado e, principalmente em crianças em idade escolar (WHO, 2001; ENGELS et al., 2002; FENWICK et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006).

A mudança de comportamento, a higiene e a disponibilidade de água potável também são usados no controle da esquistossomose, e possibilitou a erradicação da doença no Japão (WHO, 2001; ENGELS et al., 2002; FENWICK et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006). A educação sanitária pode aumentar o conhecimento sobre a doença e os cuidados de saúde, mas sem melhoras no saneamento básico e diminuição do contato com as águas contaminadas, tem efeito limitado (WHO, 2001; ENGELS et al., 2002; FENWICK et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008).

## JUSTIFICATIVA

Neste trabalho, abordamos a busca de compostos com atividade esquistossomicida em algas marinhas brasileiras para o desenvolvimento de protótipos para o tratamento da esquistossomose. O PZQ é o único fármaco disponível atualmente para o tratamento e controle da esquistossomose (WHO, 2001; ENGELS et al., 2002; FENWICK *et al.*, 2003; GRYSEELS et al., 2006; CAFFREY, 2007). É um medicamento eficaz, contra o qual ainda não foi comprovado qualquer tipo de resistência, mas há estudos que mostram a resistência do parasita em laboratório. E, não obstante, não atua em fases jovens do parasita. A oxaminiquina também foi usada para o tratamento da esquistossomose. Contudo, é apenas ativa contra a espécie *S. mansoni* (PINK et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; MAGILL et al., 2012). Estudos realizados por Caffrey (2007), El-Beshbishi et al. (2015) e Duan et al. (2012), mostraram que a artemisinina e seus derivados também apresentam atividade esquistossomicida, mas o seu uso não é recomendado em áreas onde a malária também é endêmica, sob o risco de o plasmódio desenvolver resistência ao fármaco. Diante desse cenário, a OMS reconhece a necessidade da busca de terapias alternativas (DOS SANTOS CARVALHO et al., 2008; DUAN et al., 2012; SPIVAK et al., 2014). Assim, o nosso objetivo com este trabalho é contribuir para o desenvolvimento de um novo fármaco contra a esquistossomose oriundo de fonte marinha e renovável. A escolha das algas marinhas como fonte para a busca desses compostos está associada ao fato de o Brasil ter uma extensa área costeira, 8.500 Km na porção terrestre; 12 milhas náuticas a partir da linha da costa e uma zona econômica exclusiva (ZEE) de 3,5 milhões de Km<sup>2</sup>. É uma das maiores do mundo, e alberga uma grande variedade de espécies marinhas. O Brasil possui os únicos recifes de coral do Atlântico Sul e das mais de 350 espécies dos recifes de coral do planeta, 20 foram registradas no Brasil e 8 são encontradas apenas na costa brasileira (COSTELLO et al., 2010). As algas marinhas fazem parte desse ecossistema sobrevivendo em um ambiente competitivo, sofrendo os efeitos de fatores físicos como as alterações de salinidade, temperatura, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, dessecação, tendo, portanto, necessidade de apresentar mecanismos bioquímicos para sobrevivência nessas condições

diversas. Por conta disso, algumas das espécies de algas marinhas produzem metabolitos exclusivos, não encontrados em plantas terrestres. Exemplo desses metabolitos são os terpenos halogenados, que é uma classe de compostos com certa toxicidade devido à presença desses halogénios. Os terpenos halogenados já foram reportados como sendo uma classe de compostos bioativos em vários modelos, tais como, bactérias, fungos, parasitas, entre outros.

## **OBJETIVOS:**

- Selecionar espécies de algas marinhas brasileiras com atividade em *Schistosoma mansoni*;
- Isolar compostos ativos da espécie selecionada por meio de fracionamento bioguiado;
- Caracterizar quimicamente os compostos ativos;
- Caracterizar a atividade esquistossomicida dos compostos ativos;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos em células de mamífero.

## CONCLUSÕES

- A triagem das algas dos vários grupos (Rhodophyta, Chlorophyta e Ochrophyta) permitiu a identificação de 23 espécies que apresentam algum efeito, sobre o acasalamento, a motilidade e oviposição dos parasitas de *S. mansoni*.
- Dentre as 23 espécies, foram priorizadas três espécies de algas vermelhas (*Laurencia dendroidea*, *Porphyra spiralis* e *Ochtodes secundiramea*) por matarem 100 % dos parasitas e inibiram a oviposição.
- A *O. secundiramea* foi a espécie selecionada para prosseguir com o fracionamento biomonitorado, pois algumas de suas frações e subfrações continuaram sendo ativas no *S. mansoni*.
- O fracionamento biomonitorado foi uma estratégia eficiente para identificação do composto com atividade esquistossomicida e dele foram isolados três octodenos halogenados e análogos.
- O octodeno **1** (4-bromo-1,6,8-tricloro-2-3-octodeno) foi o responsável pela atividade esquistossomicida com IC<sub>50</sub> de 49 µM e 53 µM para machos e fêmeas respectivamente e baixa citotoxicidade em células saudáveis de mamíferos com IC<sub>50</sub> de 8 a 9 vezes acima do IC<sub>50</sub> apresentado em parasitas machos e fêmeas, respectivamente, de *S. mansoni* indicando seu potencial uso como fármaco para combater a esquistossomose mansônica.
- O octodeno **3** (1-cloro-5,7-dibromo-2-3-octodeno) é um composto inédito, estes são os primeiros dados para literatura, do seu isolamento e elucidação estrutural.