
Pesquisa Acadêmica

**NEROLIDOL: SUBSTÂNCIA PRESENTE EM DIVERSAS
PLANTAS E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NO
COMBATE ÀS DOENÇAS DA POBREZA**

AUTORES

1. MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA

ESTUDANTE DE DOUTORADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

marcos.npdn@gmail.com

2. DR. JOSUÉ DE MORAES

ORIENTADOR

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

moraesnpdn@gmail.com

UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS GUARULHOS (UNIVERITAS
UNG)

NEROLIDOL: SUBSTÂNCIA PRESENTE EM DIVERSAS PLANTAS E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NO COMBATE ÀS DOENÇAS DA POBREZA

RESUMO

As Doenças Negligenciadas representam um grande problema de saúde pública em diversos países. Em particular, a esquistossomose é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em todo mundo cujo tratamento é feito com apenas um fármaco, o praziquantel. Nerolidol é uma substância presente em muitas espécies de plantas e seu uso tem sido aprovado pela (FDA) e *European Commission*. Estudos recentes mostraram o efeito anti-helmintico do nerolidol em adultos de *Schistosoma mansoni ex vivo*. No presente estudo, avaliamos o efeito do nerolidol em camundongos experimentalmente infectados com *S.mansoni*. Grupos de animais foram tratados oralmente com dose única de nerolidol 100, 200 e 400 mg/kg (vermes adultos) e com nerolidol 400 mg/kg (vermes juvenis). Os resultados demonstram uma redução na carga parasitária e na análise do oograma quantitativo e qualitativo no número de ovos/grama nas fezes. Ademais, a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou alteração no tegumento dos helmintos. Em conjunto, considerando a segurança e o baixo custo do nerolidol, os resultados deste estudo indicam que o Nerolidol é um composto promissor para o tratamento e controle da esquistossomose.

PALAVRAS-CHAVE: *Schistosoma mansoni*, Nerolidol, anti-helmintico.

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Negligenciadas são enfermidades causadas por agentes infecciosos e parasitários que ocorrem nas camadas sociais pobres. Essas patologias acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e são responsáveis por milhões de mortes anualmente e infelizmente as opções terapêuticas são insuficientes. Dentre elas, a esquistossomose é uma doença parasitária causada por parasitas do gênero *Schistosoma* que afeta principalmente as populações pobres e marginais na África, Ásia e América Latina, e tem sido negligenciada pela indústria farmacêutica e os governos (Hotez et al, 2006.). Segundo estimativas, cerca de

240 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, e cerca de 700 milhões de pessoas em risco de infecção, ocorrendo mais de 250 mil mortes por ano (WHO, 2017). No Brasil, a doença é endêmica em 19 estados com cerca de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas sendo 26 milhões em situação de risco (AMARAL, 2016). Os principais fatores dos quais a patogenia da helmintose está ligada, os mais importantes são a carga parasitária, que influencia diretamente no número de ovos, e a resposta do sistema imunológico de cada hospedeiro. O tratamento dessa parasitose é limitado a um único fármaco, praziquantel. Lançado na década de 1970, o uso extensivo tem sido objeto de preocupação no tocante ao aparecimento de parasitos tolerante/resistentes colocando em risco a eficácia do tratamento.

Considerando a dificuldade na descoberta de anti-helmínticos, a alternativa pode estar nos produtos naturais. Nesse sentido, a busca por compostos naturais ou sintéticos com propriedades esquistossomicidas tem aumentado nos últimos anos (MORAES et al., 2015). De fato, esses estudos são preponderantes para o avanço no combate e controle das doenças da pobreza. Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um álcool alifático sequesterpeno presente em óleos essenciais de várias plantas e frequentemente usado em cosméticos e produtos não-cosméticos. No tocante às propriedades medicinais, nerolidol possui efeito antiparasitário: leishmanicida (ARRUDA et al., 2005), antitrypanosomal (HOET et al., 2006) e antimalárico (LOPES et al., 1999), bem como efeito inibitório sobre o crescimento de parasitas como *Babesia* (ABOULAILA et al., 2010). Atividade contra bactérias e fungos (BREHM-STECHER e JOHNSON 2003; JOHANN et al., 2012). Propriedades como antioxidante (NETO et al., 2013), antinociceptivo (KOUDOU et al., 2005) e anti-úlceras (KLOPELL et al., 2007) tem sido relatado, entre outras, conforme revisado por CHAN (2016). Ressalte-se que o uso do nerolidol tem sido aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) e foi incluído pelo *European Commission* na lista de substâncias seguras (LAPCYNISK, 2008 ; MCGINTY, 2010).

Recentemente nosso grupo descreveu a atividade anti-helmíntica deste terpeno *in vitro* (SILVA et al., 2014). No presente estudo, em virtude da continuidade dos estudos pré-clínicos descrevemos a atividade anti-helmíntica *in vivo* do terpeno nerolidol, publicado no periódico *International Journal of Antimicrobial Agents* (SILVA et al., 2017).

2. OBJETIVO

- c) Grupo III (n = 10): camundongos infectados e tratados com nerolidol 200 mg/kg;
- d) Grupo IV (n = 10): camundongos infectados e tratados com nerolidol 400 mg/kg.

Com base na atividade em esquistossomas na fase adulta, nerolidol foi testado em camundongos que abrigavam *S. mansoni* na fase juvenil. Nesse caso, 21 dias após a infecção, um grupo de 10 camundongos foram tratados com dose oral de 400 mg/kg de nerolidol. (DE MORAES et al., 2014)

3.3 Análise da eficácia da ação esquistossomicida *in vivo*

3.3.1 Recuperação dos vermes.

Vermes intestinais de animais tratados com nerolidol foram recuperados pela técnica de perfusão (PELLEGRINO, 1956), sexuados, contados e comparados com animais não tratados e reduções da carga parasitária calculados.

3.3.2 Estágios de desenvolvimento de ovos (oograma).

Análise baseada na técnica de oogramas quantitativa e qualitativa. Um fragmento do intestino (10 mm) foi cortado e processado. Os ovos foram contados e classificados de acordo com diferentes estágios de desenvolvimento, conforme definição: imaturos, maduros ou mortos. (DE MORAES, 2014)

3.3.3 Número de ovos nas fezes.

Método Kato-Katz (KATZ, 1972) foi utilizado para o exame quantitativo de ovos de *S. mansoni* nas fezes. Amostras foram coletadas nos dois grupos experimentais, e os resultados comparados com os achados no oograma.

3.3.4 Análise do tegumento por Microscopia Eletrônica de Varredura

Camundongos adicionais foram tratados oralmente com 400 mg/kg de nerolidol e dissecados a 24 e 48 h após o tratamento (DE MORAES, 2014). Os vermes recuperados foram, enxaguados duas vezes em solução Tampão Salina fosfato (PBS) e fixados em 1 mL

de glutaraldeído a 2,5% (Merck-Millipore, Cotia, SP, Brasil). Para a obtenção das imagens os parasitas foram secados ao ar, montados em stubs e metalizados com ouro usando um revestidor de pulverização Desk II (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ), posteriormente visualizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura de alta resolução JEOL JSM-6460LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) com uma tensão acelerada de 20 kV.

4. RESULTADOS

A eficácia do nerolidol foi avaliada após tratamento em dose oral única de 400, 200 e 100 mg / kg administrada em camundongos infectados com *S. mansoni*. Os resultados demonstram uma redução estatisticamente significativa na carga de vermes ($P < 0,001$). A maior atividade foi observada com uma dose única de 400 mg / kg, com redução total da carga de vermes de 70,06%. Na dose de 200 mg / kg, a redução total da carga de vermes foi de 48,8%. Na dose mais baixa investigada (100 mg / kg), o nerolidol não mostrou efeito significativo sobre a carga de vermes (redução de 10,98%) em comparação com controles infectados não tratados. A carga total de vermes macho e fêmea de *S. mansoni* após o tratamento com nerolidol é mostrada na **Figura 2**. O tratamento na fase juvenil não foi observado resultados estatisticamente significativos na redução da carga parasitária e nos estádios de desenvolvimento de ovos (oograma).

Redução na produção de ovos dos grupos tratados com 400 e 200 mg/kg foi observado redução estatisticamente significativa ($P < 0.001$) para ovos imaturos e mortos. 100 mg / kg ($P < 0.05$) ovos imaturos. Não houve redução do número de ovos no estágio maduro nas concentrações de 400, 200 e 100 mg/kg, comparado ao grupo controle não tratado. **Figura 3**. A contagem de ovos nas fezes revelou uma redução de 75,2% na quantidade de ovos na concentração de 400 mg/kg. **Figura 4**.

Alterações no tegumento foram observadas na dose única de 400mg/kg. Nas fêmeas as imagens (**B** tratado), comparado ao grupo controle (**A**) demonstram enrugamento em toda extensão da superfície dorsal. Nos machos do grupo controle (imagem **C**) comparado ao grupo tratado (imagem **D**) ocorreu achatamento lateral nos tubérculos e perda dos espinhos. **Figura 5**.

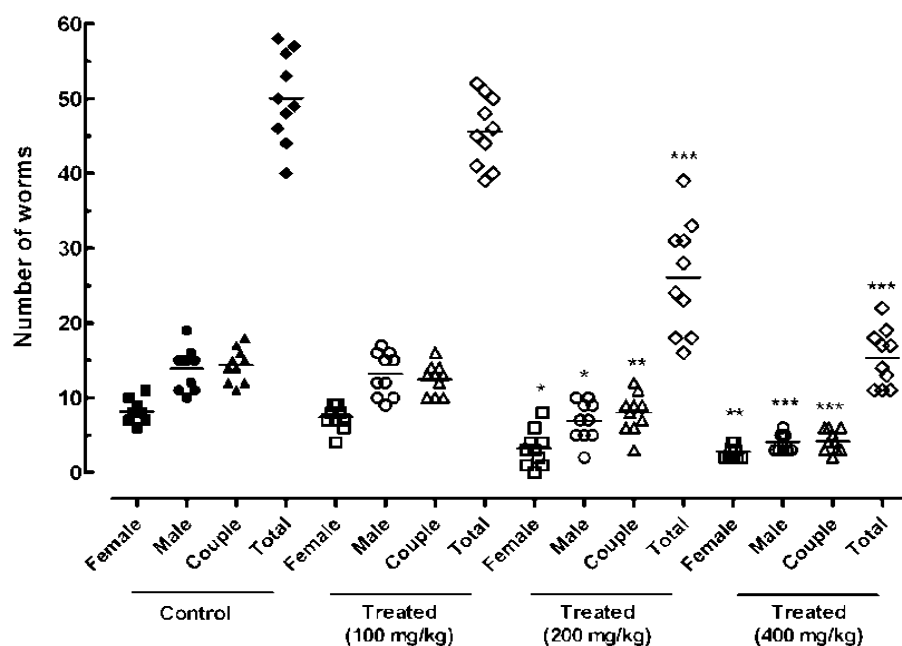


Fig.2. Redução da carga Parasitaria. Número total de vermes: redução de 70,06% (400 mg/kg) e 48,8% (200 mg / kg). ($P < 0,001$). As barras horizontais representam valores médios. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo não tratado.

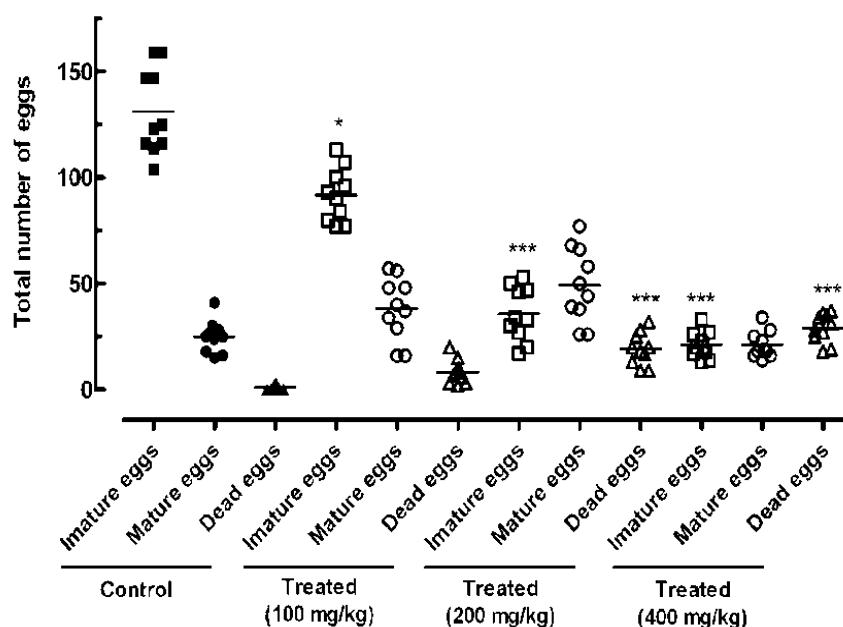


Fig. 3. Redução na produção de ovos. 84,6% (400 mg/kg), 69,7% (200 mg/kg) ($P < 0,001$), 28,89% (100 mg / kg) ($P < 0,05$) para ovos imaturos. Aumento significativo na proporção de ovos mortos 200 e 400 mg/kg ($P < 0,001$). As barras horizontais representam valores médios. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo controle não tratado.

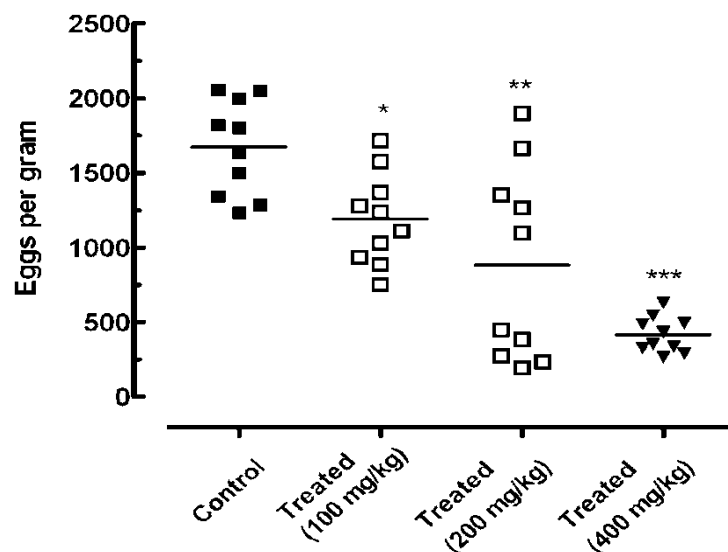


Fig. 4. Ovos por grama de fezes. Redução na quantidade de ovos 75,2% na concentração de 400 mg/kg ($P < 0.001$) e 48.32% (200mg/kg) ($P < 0.01$). Barras horizontais representam valores médios. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

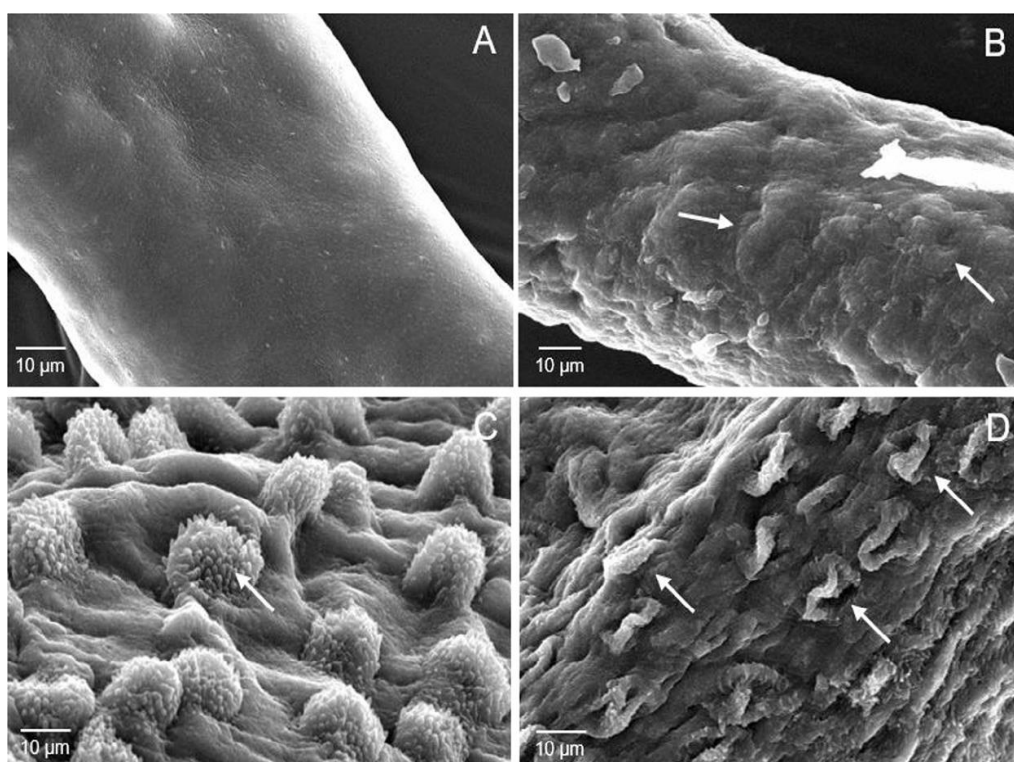


Fig. 5. Efeito do nerolidol 400mg/kg no tegumento dos vermes: **A** Fêmea (controle). **B** Fêmea (tratado). **C** Macho (Controle) e **D** Macho (tratado).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As helmintíases afetam milhões de pessoas e são responsáveis por milhares de mortes anualmente. Nesse contexto, a esquistossomose é uma helmintíase cujo tratamento depende de uma única droga, o praziquantel. Estudos alertam para o surgimento organismos resistentes/tolerante ao fármaco, por esses fatores, a eficácia da terapia poderá ser comprometida. Nesse sentido, há uma necessidade urgente na descoberta e de desenvolvimento de novos agentes esquistossomicidas.

Nerolidol, avaliado no presente estudo, além de reduzir a quantidade de vermes, o tratamento resultou na redução da produção total de ovos; de ovos imaturos e um aumento na quantidade de ovos mortos, além de causar alterações na morfologia do tegumento do parasita. Vale ressaltar que a carga parasitária e a produção de ovos são aspectos importantes que envolvem a patogenia dessa parasitose. Portanto, esses parâmetros são fundamentais na avaliação do efeito anti-helmintico desses compostos. Ademais, o tegumento do parasita tem sido objeto de estudo na compreensão da ação de agentes esquistossomicidas.

Os resultados do presente estudo mostraram que o nerolidol possui atividade *in vivo* contra *Schistosoma mansoni*. Este terpeno foi selecionado para este estudo pelo fato de que este composto tem os mecanismos bem caracterizados de toxicidade, facilmente disponível, de baixo custo e aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) e foi incluído pelo Council Of Europe na lista de substâncias seguras.

Ressalta-se, em última análise, que o presente estudo resultou em publicação no renomado periódico *International Journal of Antimicrobial Agents* (Fator de Impacto 4.307, Qualis A1) da Sociedade Internacional de Quimioterapia Antimicrobiana (International Society of Antimicrobial Chemotherapy).

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro. Dr. Josué de Moraes bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, Diretor do Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz, Dra. Silmara M. Alegretti (Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia,

Universidade Estadual de Campinas), Dra. Maria C. Salvadori e Dra. Fernanda S. Teixeira, (Instituto de Física, Universidade de São Paulo), Dr. Damião P. de Sousa (Departamento de Ciências, Universidade Federal da Paraíba).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006. Suppl. 1.

CHAN, W.K.; TAN, L.T.H.; CHAN, K.G.; LEE, L.H.; GOH, B.H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**. V. 21, 529. 2016.

DE MORAES, J., DE OLIVEIRA, R.N., COSTA, J.P., JUNIOR, A.L., DE SOUSA, DP., FREITAS, R.M., ALLEGRETTI, S.M., PINTO, P.L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, p. e2617, 2014.

HOTEZ, P.; OTTESEN, E.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. **Adv Exp Med Biol**. V.582, pag. 23–33, 2006.

KATZ, N.; CHAVES, A.; Pellegrino, J.P. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. 14: 397–400. 1972

LAPCZYNSKI, A. ; BHATIA, S.P. ; LETIZIA, C.S. ; API, A.M. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food Chem. Toxicol**. v. 46 Suppl 11:S247-50,2008.

McGINTY, D. ; LETIZIA, C.S. ; API, A.M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). **Food Chem. Toxicol.** v. 48 Suppl 3:S43-5.2010

MORAES J. **Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens.** In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. ed. Current Topics in Tropical Medicine. InTech. Rijeka: p. 333-358, 2012.

MORAES J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Med. Chem.** 7(6): 801-820, 2015.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA A.F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev. Bras. Malariol.**, v. 8, p. 589-597, 1956.

SILVA, M.P.; OLIVEIRA, G.L.; DE CARVALHO, R.B.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; PINTO, P.L.; DE MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v. 19, p. 3793–3803, 2014

SILVA, M.P.; DE OLIVEIRA, R.N.; MENGARDA, A.C.; ROQUINI, D.B.; ALLEGRETTI, S.M.; SALVADORI, M.C.; TEIXEIRA, F.S.; DE SOUSA D.P.; PINTO, P.L.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE MORAES, J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis **Int J Antimicrob Agents**. V.50(3), p.467-472, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. Geneva, Switzerland: **WHO**; 2017. Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. [Accessed 21 March 2017].