



## **ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO CINAMALDEÍDO SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE**

Aline Ávila Brustolin, Tatiane França Perles Mello, Thais Gomes Verzignassi Silveira, e-mail: a.a.brustolin@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Palavras-chave:** leishmaniose tegumentar americana, cinamaldeído, leishmania

### **Resumo**

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por três principais espécies, dentre elas a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O tratamento disponível possui alto efeito tóxico que impede a continuidade do tratamento gerando altos gastos ao sistema de saúde. Dessa forma, este estudo investigou a atividade leishmanicida do cinamaldeído sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e avaliou a citotoxicidade para as células vermelhas do sangue, visando o seu uso como uma nova estratégia para o tratamento da LTA. Adicionou-se o cinamaldeído diluído em placas contendo o parasito, e incubou-as por 24, 48 e 72 horas a 25°C. As placas foram centrifugadas e foi adicionada uma solução de XTT e PMS em salina. Após 3 horas de incubação a 37°C a leitura foi realizada em leitor de microplacas. Para a atividade sobre as células vermelhas do sangue preparou-se uma suspensão de hemácias em solução salina estéril de glicose. O cinamaldeído e a suspensão de hemácias foram encubados a 37°C. Após 2 horas as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes lidos em leitor de microplacas. O cinamaldeído, portanto, apresentou DL50 de 212,24; 212,20 e 212,14 com erro padrão de  $\pm 0,031$  para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Apresentando atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Já a citotoxicidade em células vermelhas do sangue revelou 0% de hemólise de 62,5 $\mu$ M a 2000 $\mu$ M e apenas 1,9% de hemólise na concentração de 4000 $\mu$ M do cinamaldeído, não apresentando toxicidade para as células vermelhas do sangue.

### **Introdução**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa e de evolução crônica. A LTA é considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes do mundo (Organização Mundial da Saúde, 2010) e é causada pelos protozoários do



gênero *Leishmania*. Dentre as principais espécies envolvidas em sua etiologia no Brasil encontra-se a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Seus sintomas apresentam-se como lesões ulceradas na pele que podem variar em tamanho e quantidade.

O tratamento de primeira escolha para a LTA são os antimoniais pentavalentes, sintetizados pela primeira vez por volta de 1945. A dose recomendada é de 20mg Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia, por 30 dias, através da via parenteral. A segunda opção de tratamento é a anfotericina B e a pentamidina. Esses medicamentos além de possuírem elevada toxicidade, e média eficácia, proporcionam sérios efeitos colaterais que fazem necessária a interrupção do tratamento, ou levam a desistência por parte do próprio paciente.

Dessa forma, o cinamaldeído vem sendo estudado em diversas áreas, como a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica com resultados promissores. Apresenta atividade antifúngica (LORENZETTI, 2011), atividade antibacteriana (PROBST, 2012, BURU, 2014), anti-inflamatória (CHAO, 2008; MUHAMMAD, et al, 2014) e anti-diabética (MING-YAN, et al, 2015).

## **Materiais e métodos**

### *Substâncias Químicas*

O cinamaldeído (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA) testado e a anfotericina B (Cristália, São Paulo, SP, Brasil), usada como controle positivo da atividade leishmanicida, foram adquiridos comercialmente.

### *Cultivo de parasitos*

A *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foi cultivada em meio de cultura 199 suplementado com 10% de soro bovino, 1% urina humana estéril, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina a 25°C e pH 7,2 . Os parasitos foram mantidos por cultivos periódicos.

### *Atividade sobre formas promastigotas*

Os parasitos ( $4 \times 10^6$  promastigotas/mL) foram incubados com cinamaldeído (1000 a 0,48 µM) diluído seriadamente em razão dois em placas de cultura de 96 poços. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 25°C. Após as placas foram centrifugadas e em seguida adicionou-se uma solução de XTT (500 µg/mL) e PMS (50 µg/mL) em salina 0,9% e incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> . Após 3 horas a leitura foi realizada em leitor de microplacas nos filtros 450/620nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### *Citotoxicidade para células vermelhas do sangue*

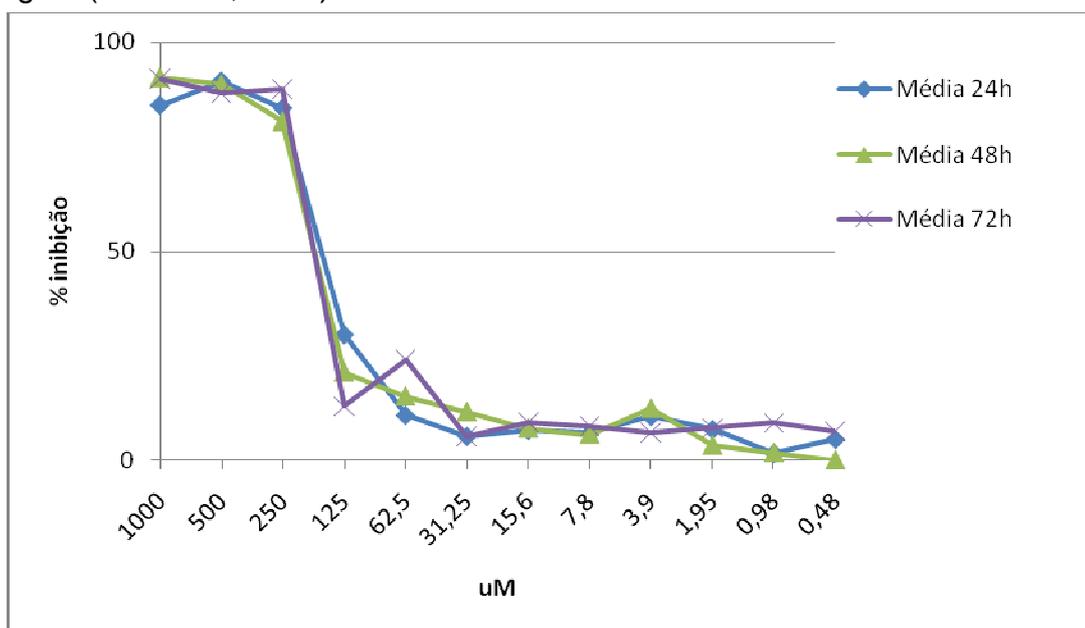
Foi preparada uma suspensão de hemácias a 6 % de sangue humano fresco defibrinado em solução salina estéril de glicose a 1%. O cinamaldeído (4000 a 62,5 µM) foi distribuído em placas de cultura de 96



poços e incubado com a suspensão de hemácias a 37°C. Após 2 horas, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram retirados e passados para outra placa que foi lida em leitor de microplacas a 550 nm.

## Resultados e Discussão

A atividade leishmanicida do cinamaldeído apresentou  $DL_{50}$  de 212,24  $\mu\text{M}$ ; 212,20  $\mu\text{M}$  e 212,14  $\mu\text{M}$  com erro padrão de  $\pm 0,031 \mu\text{M}$  para 24, 48 e 72 horas, respectivamente, de incubação com as promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O cinamaldeído, nas concentrações entre 125 e 1000  $\mu\text{M}$ , apresentou de 41% a 84% de atividade antifúngica de controle para os fungos *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro (LORENZETTI, 2011). Já para as cepas, de diferentes linhagens, de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Salmonella typhimurium* apresentou  $CIM_{90\%}$  de 0,23 mg/ml (PROBST, 2012).



**Figura1:** Atividade leishmanicida do cinamaldeído sobre as formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

A citotoxicidade em células vermelhas do sangue revelou 0% de hemólise nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$  e apenas 1,9% de células vermelhas hemolisadas na concentração de 4000  $\mu\text{M}$  do cinamaldeído. Já a anfotericina B, com a mesma metodologia, apresentou 84,07% de hemólise em 16,9  $\mu\text{M}$  (Mello, et al, 2014). Dessa forma, o cinamaldeído demonstra ser menos tóxico que a anfotericina B para as células vermelhas do sangue.



## Conclusões

O cinamaldeído, portanto, demonstrou atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e não apresentou toxicidade às células vermelhas do sangue. Novos estudos devem ser realizados a fim de avaliar seus efeitos *in vivo*.

## Agradecimentos

Agradeço ao CNPq por ter possibilitado o financiamento desta pesquisa, a professora Thaís Silveira pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

BURU, A. S.; et al. *In vitro antibacterial effects of Cinnamomum extracts on common bacteria found in wound infections with emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, 2014.

CHAO, L. C.; et al. *Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling*. Science Direct, 2007.

LORENZETTI, E.R., et al. *Bioatividade de óleos essenciais no controle de Botrytis cinérea isolado de morangueiro*. 2011. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13nspe/a19v13nspe.pdf>. Acesso em: 20 mar, 11:02.

MELLO, T. F. P., et al. *Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in Leishmania (Viannia) braziliensis*. Experimental Parasitology, 2014.

MING-YAN, Y., et al. *Nephropathy antidiabetic compounds of Cinnamomum cassia*, 2015.

MUHAMMAD, J. S, et al. *Anti-inflammatory Effect of Cinnamaldehyde in Helicobacter pylori Induced Gastric Inflammation*, 2014.

PROBOST, S. I. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico*. UNESP. Botucatu, 2012.

World Health Organization. Technical Report Series 949- *Control of Leishmaniasis*, 2010. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 20 mar. 2015, 09:21