

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA *Galesia integrifolia* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Bruno César Gomes Buranello (PIBIC/FA), Marielle Priscilla de Paula Silva, Fabiana Borges Padilha, Keila Fernanda Raimundo, Zilda Cristiani Gazin, Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientadora), email: mvclonardoni@gmail.com

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina II – Doenças infecciosas e parasitárias.

Palavras-chave: *Leishmania*; leishmaniose cutânea; fitoterápicos.

Resumo

O tratamento da leishmaniose tegumentar americana apresenta inúmeros efeitos adversos que podem levar os pacientes ao seu abandono. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade dos óleos essenciais de folhas, flores e frutos de *Galesia integrifolia*, uma espécie nativa do Brasil. Foi estudada a atividade leishmanicida por meio do ensaio colorimétrico com o XTT, que avalia a viabilidade dos parasitos e células após o tratamento com diferentes concentrações dos óleos essenciais, a citotoxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos e a lise de hemácias. Os óleos essenciais da *G. integrifolia* apresentaram atividade leishmanicida para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento por 24, 48 e 72 horas, com doses letais (DL_{50}) de 0,049, 0,022 e 0,016 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial das folhas, de 0,045, 0,025 e 0,028 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo dos frutos e de 0,053, 0,020 e 0,016 $\mu\text{g/mL}$ para o das flores, respectivamente. Mesmo nas maiores concentrações estudadas os óleos essenciais induziram menos de 1% de hemólise em eritrócitos. A atividade citotóxica para macrófagos (CC_{50}) dos óleos essenciais das folhas, frutos e flores de *G. integrifolia* foi de 0,026, 1,23 e 1,46 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O índice terapêutico de seletividade (ITS), que é dado pela razão entre a CC_{50} e a DL_{50} de 24 horas, foi de 0,50, 27,33 e 27,55, para os óleos essenciais das folhas, frutos e flores, respectivamente. Os resultados sugerem que os óleos essenciais de *G. integrifolia* tem efeito leishmanicida e potencial para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

Introdução

No tratamento para leishmaniose tegumentar americana (LTA), são usados os antimoniais pentavalentes e as drogas de segunda escolha são pentamidina e a anfotericina B. Estes fármacos apresentam inúmeros efeitos adversos (fraqueza, anorexia, vômitos, tontura, náuseas, dor abdominal,

febre, edema, cefaléia, palpitação e insuficiência renal aguda) (Brasil, 2002), que são uma das principais causas de abandono do tratamento (Fournet et al, 1996). Assim, a busca de alternativas terapêuticas é importante para reduzir as reações adversas, os custos e aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento.

As plantas são estudadas como fontes primárias de novos fármacos. A espécie *Gallesia integrifolia* é uma planta nativa do Brasil, conhecida como pau d'algo. Estudos prévios indicaram a presença compostos com propriedades anti-inflamatória, anti-oxidante, antiviral, antifúngica e antibacteriana (Arunachalam et al, 2016), que motivaram a investigação da atividade de seus óleos essenciais para formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, nº 6112140317.

Atividade anti-Leishmania para formas promastigotas

Numa placa de cultura de células de 96 poços cada óleo essencial de *G. integrifolia* foi diluído seriadamente, a partir de 8,6 µg/mL para o óleo dos frutos, 9,2 µg/mL para o óleo das flores e 9,75 µg/mL para o das folhas. A seguir, foram adicionados 100 µL de uma suspensão contendo 4×10^7 promastigotas/mL de *L. (L.) amazonensis* e as placas foram mantidas a 25°C por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade dos parasitos foi determinada pelo método colorimétrico de redução do XTT (2,3-Bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H tetrazolium-5-carboxinilida). Para isso, 100 µL de XTT (0,2 mg/mL) ativado com 200 µM de metossulfato de fenazina (PMS) foram adicionados a cada poço e após 3 horas a 37°C foi realizada a leitura numa leitora de microplacas, a 450/620 nm. Como controle negativo foram usadas culturas não tratadas e como controle do experimento a anfotericina B (AnfoB) a 125 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata, repetidos pelo menos três vezes e os resultados expressos como a menor concentração do óleo essencial que matava 50% dos parasitos (DL₅₀).

Determinação da atividade hemolítica

Numa microplacas de 96 poços, os óleos essenciais dos frutos, flores e folhas de *G. integrifolia* foram diluídos em série a partir de 8,6 µg/mL, 9,2 µg/mL e 9,75 µg/mL, respectivamente. A seguir foram adicionados 100 µL de uma suspensão de hemácias humanas tipo "O" a 6% em solução salina 0,9 % estéril com 1 % de glicose e a microplaca incubada a 25°C por 2 horas. As amostras foram centrifugadas a 1100 rpm por 5 minutos, o sobrenadante transferido para nova placa e a leitura realizada em leitora de microplaca a 550/620 nm. A atividade hemolítica foi expressa conforme a equação: Hemólise (%) = $100 - [(Ap - As) / (Ap - Ac) \times 100]$, na qual Ap, As e Ac são as absorbâncias do controle positivo, da amostra teste e do controle negativo,

respectivamente. O Triton X-100 a 4% foi usado como controle positivo de hemólise e como controle negativo, uma suspensão de hemácias sem adição de nenhum composto. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes.

Citotoxicidade para macrófagos murinos

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c em suspensão contendo 1×10^6 macrófagos/mL foram distribuídos em placa de cultura de 96 poços. Após 2 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ as células não aderentes foram removidas por lavagens. Os macrófagos aderentes foram tratados com concentrações a partir de 8,6 µg/mL, 9,2 µg/mL e 9,75 µg/mL dos óleos essenciais dos frutos, flores e folhas de *G. integrifolia*, respectivamente, e cultivados por 24 horas. Para a determinação da viabilidade celular 100 µL de uma solução de XTT (100 µg/mL) e PMS (10 µg/mL) foi adicionada sobre as células. Após 3 horas a 37°C foi realizada a leitura a 450/620 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, repetidos pelo menos três vezes e os resultados expressos como a menor concentração do óleo essencial que matava 50% dos macrófagos (CC₅₀).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., USA), e após a verificação da distribuição normal, foi realizada a análise pelo teste *t* Student. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os óleos essenciais da *G. integrifolia* apresentaram atividade para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após a incubação por períodos de 24, 48 e 72 horas, com DL₅₀ de 0,049, 0,022 e 0,016 µg/mL para o óleo essencial das folhas, DL₅₀ de 0,045, 0,025 e 0,028 µg/mL para o óleo dos frutos e de 0,053, 0,020 e 0,016 µg/mL para o óleo essencial das flores, respectivamente para os tempos estudados. Estes valores de DL₅₀ não foram estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$). A anfotericina B, usada como droga de referência, apresentou valores de DL₅₀ de 0,40, 0,40 e 0,05 µg/mL após 24, 48 e 72 horas. Considerando a possibilidade de uso numa formulação para tratamento de LTA, foi estudada a propriedade destes óleos essenciais de *G. integrifolia* em determinar hemólise em eritrócitos humanos e a citotoxicidade para macrófagos de camundongos BALB/c. Na maior concentração estudada (4,88 µg/mL) o óleo essencial das folhas induziu menos de 1% de hemólise em eritrócitos. Os óleos essenciais dos frutos e das flores não induziram hemólise de eritrócitos. A atividade CC₅₀ dos óleos essenciais das folhas, frutos e flores de *G. integrifolia* foi de 0,026, 1,23 e 1,46 µg/mL, respectivamente. A anfotericina B apresentou CC₅₀ de 0,50 µg/mL. Assim, obteve-se que o índice terapêutico de seletividade (ITS), que é dado pela razão entre a CC₅₀ e a DL₅₀ de 24 horas, dos óleos essenciais das folhas, frutos e flores de *G. integrifolia* com valores de 0,50, 27,33 e 27,55, respectivamente, indicando que são mais seletivos para os parasitos

que para as células de mamíferos.

Tabela 1 – Dose letal (DL₅₀), citotoxicidade (CC₅₀) e índice terapêutico de seletividade (ITS) dos óleos essenciais das folhas, frutos e flores de *Galesia integrifolia* para promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Óleo essencial	DL ₅₀ (µg/mL)			CC ₅₀ (µg/mL)	ITS
	24 h	48 h	72 h		
Folhas	0,049	0,022	0,016	0,026	0,53
Frutos	0,045	0,025	0,028	1,23	27,33
Flores	0,053	0,020	0,016	1,46	27,55
Anfotericina B	0,40	0,40	0,050	nd	nd

nd: não determinado.

Conclusões

Os resultados sugerem que os óleos essenciais estudados apresentam atividade leishmanicida, com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

Agradecimentos

Ao CNPq/Fundação Araucária.

Referências

ARUNACHALAM, K.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; AGUIAR, R. W. S.; SILVA, L. I.; OLIVEIRA, R. G.; BALOGUN, S. O. *Galesia integrifolia* (Spreng.) Harms: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities and mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 184, p. 28–137, 2016.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; DE ARIAS, A.R.; DE ORTIZ, S.T.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H. et al. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; v. 40, p. 2447–2451, 1996.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE –FUNASA. Ministério da Saúde - MS. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5º Edição. vol 2: p.399, 2002.