

AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E MACRÓFAGOS J774.A1

Ana Paula Desiree de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem)¹, Mariana de Souza Terron Monich¹, Zilda Cristani Gazin², Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador)¹, e-mail: mvclonardoni@gmail.com.

¹ Universidade Estadual de Maringá /Departamento de Biomedicina e Análises Clínicas, Maringá/Pr

² Universidade Paranaense /UNIPAR, Umuarama,/PR

Ciências da saúde – Doenças infecciosas e parasitárias

Palavras-chave: *Leishmania*, fitoterapia, óleo essencial

Resumo:

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença parasitária de importância no cenário nacional, devido a sua magnitude e impacto social. O tratamento da LT é feito com antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, medicamentos de custo elevado e com alta toxicidade, o que estimula a pesquisa de novas alternativas de tratamento. O óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) tem atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Porém, a atividade do óleo essencial de *T. riparia* contra a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVb), que é um importante agente da LT e pode causar destruição de tecidos cartilagosos da orofaringe, ainda não é conhecida. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade do óleo essencial de *T. riparia* para formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e a citotoxicidade para macrófagos murinos. Para isso, formas promastigotas de LVb e macrófagos J774.A1 foram submetidos ao tratamento com óleo essencial de *T. riparia* em diferentes concentrações e tempos de incubação. Os resultados mostraram que a dose letal 50% (DL50) para promastigotas de LVb foi 0,153 µg/mL e 0,216 µg/mL, após 24 e 48 h, respectivamente, não havendo diferença significativa entre esses tempos. A citotoxicidade do TrEO para 50% de macrófagos (CC50) foi 0,102 µg/mL após 24 h e o índice de seletividade (CC₅₀/DL₅₀) foi 0,66. Estes resultados sugerem que o óleo essencial de *T. riparia* tem potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa endêmica no Brasil, acometendo pessoas de todas as faixas etárias e de ambos os sexos. As espécies de *Leishmania* que frequentemente causam essa doença no Brasil são *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Esta última espécie é um

importante agente da LT e pode causar destruição de tecidos cartilagosos da orofaringe, resultando nas formas desfigurantes e incapacitantes da doença¹.

Há décadas, o tratamento das leishmanioses é baseado na utilização de antimoniais pentavalentes e anfotericina B, porém apresentam falha terapêutica, além de alta toxicidade, o que estimula desenvolvimento de novas terapias para a doença².

A planta *Tetradenia riparia*, conhecida popularmente como 'falsa Mirra', é utilizada na medicina popular por comunidades africanas, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, entre outras³. Além disso, o óleo essencial desta planta apresentou ação inibitória sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania.) amazonensis*^{4,5}. Entretanto, a ação deste óleo essencial para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, ainda não foi estudada. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar a ação do óleo essencial de *T. riparia* para *Leishmania (Viannia) braziliensis* avaliando o seu potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Materiais e métodos

Atividade do óleo essencial de T. riparia para formas promastigotas de L. (V.) braziliensis

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *T. riparia* (5 µg/mL até 0,002 µg/mL) ou de anfotericina B (62,5 µg/mL até 0,03 µg/mL) por 24 e 48 horas, à 25 °C. Em seguida, a viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do XTT⁴. Após 3-5 horas à 37°C da adição do XTT a leitura foi realizada em leitora de microplacas a 450/620 nm. A dose letal (DL₅₀) foi definida como a que mata 50% dos parasitos em comparação com parasitos não tratados.

Citotoxicidade para macrófagos J774.A1

Macrófagos J774.A1 foram distribuídos em placa de 96 poços e incubados por 48 horas à 37°C, e 5% de CO₂. Posteriormente, foram tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *T. riparia* (0,3 µg/mL até 0,01 µg/mL) ou de anfotericina B (62,5 µg/mL a 1,95 µg/mL), por 24 horas a 37°C, e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do XTT. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi definida como a que reduziu em 50% a sobrevivência dos macrófagos quando comparada com aqueles não tratados (controle de viabilidade). O índice de seletividade terapêutica foi calculado como: TSI = CC₅₀/DL₅₀.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student para avaliar a significância estatística entre os tempos de incubação e fármacos estudados. Foram consideradas significativas as diferenças com *p*<0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram que a DL₅₀ do TrEO e da anfotericina B após 24 e 48 horas foi de 0,153 µg/mL e 0,216 µg/mL e 1,37 µg/mL e 0,81 µg/mL, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os tempos estudados ($p < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1 - Atividade do óleo essencial de *Tetradenia riparia* e da anfotericina B para formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e para macrófagos JJ74

Fármacos	DL ₅₀ (µg/mL) ± DP		CC ₅₀ /24h	
	24h	48h	± DP(µg/mL)	ITS
TrEO	0,153 ± 0,06*	0,216 ± 0,04	0,102 ± 0,002	0,66
AmB	1,37 ± 0,40*	0,81 ± 0,29	ND	ND

TrEO: óleo essencial de *Tetradenia riparia*. AmB: anfotericina B; DL₅₀: dose letal para 50% dos parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células murinas; ITS: Índice de seletividade terapêutica (CC₅₀/DL_{50 24hrs}); DP: Desvio padrão; ND: não determinado; Os valores expressos são referente a média de três experimentos independentes. * diferença significativa entre os valores de DL₅₀ de 24 horas $p < 0,05$.

Em um estudo conduzido por Demarchi *et al* (2015), também não observou diferenças significativas entre os tempos de incubação ao avaliar o efeito do TrEO sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; em seu estudo a DL₅₀ do óleo essencial de *T. riparia* após 24 e 48 horas foi de 0,5 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente. Apesar do TrEO possuir características sazonais, com variações nas concentrações de seus componentes entre as estações do ano, não foi observada diferença significativa em sua atividade contra *L. (L.) amazonensis*⁵. Portanto, nossos resultados sugerem uma maior suscetibilidade da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* ao tratamento com óleo essencial de *Tetradenia riparia*.

O TrEO apresentou uma menor DL₅₀, quando comparado à anfotericina B (fármaco de referência), sugerindo que o óleo pode ser uma alternativa de tratamento mais eficaz e em menores concentrações do que a anfotericina B. Esses resultados corroboram com outros estudos sobre a atividade anti-*Leishmania* do TrEO^{4,5}, reforçando a ideia do seu potencial terapêutico.

A CC₅₀ do TrEO foi de 0,102 µg/mL (Tabela 1), concentração inferior a encontrada por Cardoso *et al*, 2015 que identificou uma CC₅₀ de 1.022,21 ng/ mL (102 µg/mL). Essa diferença na citotoxicidade pode estar relacionada ao ano de extração do óleo, levando em consideração que as alterações dos padrões climáticos possam ter interferido na composição do óleo. Por outro lado, a concentração foi semelhante à encontrada para células peritoneais murinas no mesmo estudo, o que sugere que a sensibilidade ou resistência das culturas celulares podem influenciar na avaliação da citotoxicidade do composto. O índice de seletividade terapêutico foi de 0,66, indicando uma maior seletividade do fármaco para as células murinas do que para as

formas promastigotas do parasito. Entretanto, como *Leishmania* é um parasito intracelular, a morte das células infectadas pode ser favorável para o controle e resolução da doença ⁴.

Conclusões

O óleo essencial de *Tetradenia riparia* possui um potencial como alternativa ao tratamento da leishmaniose cutânea, causada por diferentes espécies de *Leishmania*. Porém, estudos complementares com formas amastigotas e *in vivo* devem ser realizados para se confirmar esse potencial.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pela bolsa de IC, ao Laboratório de Imunologia clínica pelo suporte em todas as etapas deste projeto. À professora Maria Valdrinez pela orientação e incentivo, que tornaram possível a conclusão deste projeto.

Referências

1. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2. Ed, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
2. FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for oral drugs. **Molecules**, n.14, p. 2317–2336, 2009.
3. VAN PUYVELDE, L; NYIRANKULIZA, S.; PANEBIANCO, R.; BOILY, Y.; GEIZER, I.; SEBIKAL, I B. *et al.* Active principles of *Tetradenia riparia*. I. Antimicrobial activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7 alpha,18-diol. **Journal Ethnopharmacology**, n.17, v.3, p. 269-275, 1986.
4. DEMARCHI, I.G; THOMAZELLA, M. V; DE SOUZA TERRON, M; LOPES, L; GAZIM, Z.C; CORTEZ, D.A.G; DONATTI, L; ARISTIDES, S.M.A; SILVEIRA, T.G.V; LONARDONI, M.V.C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, n. 157, p. 128-137, 2015.
5. CARDOSO, B.M; MELLO, T.F.P; LOPES, S.N, DEMARCHI, I.G; LERA D. S.L; PEDROSO, R.B; CORTEZ, D.A; GAZIM, Z.C; ARISTIDES, S.M.A.; SILVEIRA, T.G.V; LONARDONI, M.V.C. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.8, p.1024-1034, 2015.