

AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE CEPAS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*

Larissa Ferreira de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cínthia Akemi Tanoshi, Tânia Alexandrino Becker, Daniel Augusto Nunes de Lima, Raíssa Bocchi Pedroso, Sandra Mara Alessi Aristides. E-mail: lari.ferreira200@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área: Medicina II. **Subárea do conhecimento:** Doenças infecciosas e parasitárias

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose, gengibre.

Resumo

As leishmanioses são doenças infecciosas negligenciadas que afetam em torno de 0,7 a 1,3 milhões de pessoas ao ano globalmente. Um importante microrganismo causador da Leishmaniose Tegumentar, a forma mais frequente da doença, é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Alternativas terapêuticas contra esses parasitos, que sejam mais acessíveis e menos tóxicas necessitam de mais pesquisas. No intuito de obter alternativas para o tratamento, foram realizados ensaios com duas diferentes cepas: MHOM/BR/1987/M11272, conhecida como cepa padrão e MHOM/BR/2000/1655, um isolado clínico resistente ao tratamento por glucantime - a droga usual para tratamento da doença. Como tratamento alternativo foi utilizado o óleo do rizoma do gengibre, *Zingiber officinale Roscoe*. O ensaio reproduzido obteve IC₅₀ equivalente a $23,48 \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$ para a cepa padrão e $67,40 \pm 5,56 \mu\text{g/mL}$ para o isolado. Níveis de citotoxicidade não foram observados nem sobre o ensaio de macrófagos e tampouco sobre eritrócitos humanos, indicando uma possível ferramenta no combate às leishmanioses com as linhagens padrão ou para cepas resistentes.

Introdução

As leishmanioses são parasitoses tropicais e subtropicais negligenciadas e endêmicas em dezenas de países, causadas por diversas espécies de protozoários dos quais derivam seu nome, o gênero *Leishmania*. Dentre as consequências da Leishmaniose Tegumentar (LT), o subtipo mais comum, há o desenvolvimento de lesões cutâneas ulcerosas únicas ou múltiplas e que podem progredir para lesões mucosas, afetando principalmente a nasofaringe. Em razão disso está entre as seis principais enfermidades infecciosas, devido a sua alta magnitude e capacidade deformativa. Estima-se em torno de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos no mundo anualmente, sendo que a *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi a primeira espécie retratada como causadora de LT e a mais importante no Brasil (BRASIL, 2017). A terapêutica atual é à base de antiomoniais pentavalentes (Glucantime®), pentamidinas, anfotericina B e mitelfosina, no entanto o tratamento apresenta

elevada toxicidade e ineficácia (BRASIL, 2017). Constituintes naturais acessíveis, com menores níveis de toxicidade que os tratamentos atuais e que, no entanto, apresentam resultados significativos, representam uma promissora alternativa de tratamento de doenças. O rizoma de *Zingiber officinale Roscoe*, mais conhecido como gengibre, é o condimento mais comumente utilizado no mundo e é amplamente empregado no tratamento de diversas doenças. Suas propriedades podem estimular respostas antimicrobianas e imunológicas (RAHMANI *et al*, 2014). Apesar dessas propriedades do vegetal, poucos trabalhos foram conduzidos nesse direcionamento, portanto o objetivo desse ensaio é elucidar o efeito de seu óleo essencial sobre o parasito e avaliar sua citotoxicidade sobre macrófagos e eritrócitos.

Materiais e métodos

Obtenção do composto-teste

O óleo de gengibre foi cedido pela Professora Doutora Tânia Alexandrino Becker e seu mestrando Daniel Augusto Nunes de Lima do Laboratório de Patologia da Universidade Estadual de Maringá após extração do gengibre *in natura* por destilação simples. A origem da raiz é da região de Marialva - PR. e comercializado na região de Maringá - PR. Sua estocagem foi ao abrigo da luz, armazenado em vidro âmbar e armazenado em geladeira.

Manutenção de culturas

Foram utilizadas as cepas do parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* registradas como MHOM/BR/1987/M11272 e um isolado clínico resistente ao tratamento por glucantime: MHOM/BR/2000/1655. As cepas foram cultivadas em frascos de cultura de células (25 cm² e 75 cm²), suplementadas com Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®, New York, NY, USA) e meios de cultura como 199 (Gibco®, New York, NY, USA) pH 7.0 ou RPMI 1640 (Gibco®, New York, NY, USA) pH 6,8. Sob repiques e incubação a cada 4 dias a 25 °C.

Ensaio sobre formas promastigotas de Leishmania (Viannia) braziliensis

Culturas contidas em frascos de cultura celular foram centrifugadas três vezes a 2500 RPM, por 10 minutos, a 20 °C (Hettich Zentrifugen Rotina 420R, Tuttlingen, Alemanha). Os sobrenadantes foram separados do pellet e quantificado o número de leishmanias por mL. Foram realizadas diluições do óleo de gengibre em microplacas de 96 poços, adicionando diferentes concentrações do óleo aos poços com a concentração de parasitos a 4×10^7 promastigotas/mL. As placas foram incubadas a 25 °C por 24 horas. Posteriormente, adicionados XTT [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil) -2H-tetrazólio-5-carboxanilida] (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) como método colorimétrico para leitura da microplaca por espectrofotometria nos filtros 450/620 nm (Asys Expert Plus Microplate Reader, Analytical, Biochrom Ltd, UK).

Ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos de linhagem

Na análise da citotoxicidade, as culturas de macrófagos murinos da linhagem J774A.1 foram centrifugadas a 1000 RPM, por 10 minutos, a 4 °C. Macrófagos na concentração de 5×10^5 /mL foram incubados em uma placa de 96 poços a 37 °C por 48 horas, a 5% de CO₂. Após esse tempo o sobrenadante dos poços foi retirado e diferentes concentrações do óleo de gengibre foram adicionadas. Logo após foram incubadas a 37 °C por 24 horas, a 5% de CO₂ para posterior adição de XTT para leitura nos filtros 450/620 nm.

Ensaio de toxicidade in vitro sobre hemácias

Para o ensaio, sangue de carneiro desfibrinado estéril (Laborclin) foi adicionado em salina glicosada (pH 7,25) e centrifugado a 2500 RPM, 20 °C por 10 minutos (Hettich Zentrifugen Rotina 420R, Tuttlingen, Alemanha). Do pellet, uma solução de 6% de hemácias em salina glicosada foi preparada e plaqueada em placa de 96 poços. Uma diluição seriada da droga foi feita e adicionada sobre as hemácias e incubadas a 37 °C por 2 horas, a 5% de CO₂ e a leitura da microplaca foi feita em espectrofotometria nos filtros 550/620 nm.

Resultados e Discussão

Foi observado que a concentração máxima do óleo (2 mg/mL) ocasiona pouco a nenhuma hemólise das células quando comparados ao controle positivo (em conformidade com o estudo de Duarte e colaboradores). A Concentração Citotóxica para 50% do tapete celular (CC₅₀) foi > 1000 µg/mL, demonstrando não afetar a atividade dos macrófagos, considerados um dos principais mecanismos de resposta inflamatória da imunidade inata contra os protozoários.

Através dos ensaios sobre promastigotas de *L. (V) braziliensis* foram obtidas as IC₅₀ ± desvio padrão das cepas. Para a cepa padrão MHOM/BR/1987/M11272, 23,48 ± 1,42 µg/mL e para a cepa MHOM/BR/2000/1655 67,40 ± 5,56 µg/mL. Não existem estudos anteriores sobre o efeito do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre *L. (V) braziliensis*, porém alguns trabalhos relatam a ação do rizoma sobre outras espécies do protozoário. Monzote e colaboradores obtiveram uma IC₅₀ ± DP de 39,9 ± 3,4 µg/mL, enquanto Duarte e colaboradores encontraram valores de IC₅₀ de 125,5 µg/mL em promastigotas de *L. amazonensis*. Diferente disso, Le e colaboradores não observaram atividade significativa do óleo essencial sobre *Leishmania mexicana mexicana*, pois a porcentagem de viabilidade de promastigotas se manteve a 94,29 ± 3,83, atingindo melhores resultados com *Zingiber zerumbet* com IC₅₀ de 0,19 ± 0,05.

Conclusões

O óleo essencial de gengibre demonstra atividade antiparasitária significativa contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e não apresenta citotoxicidade às hemácias ou

macrófagos, mostrando-se, portanto, um composto de interesse para possíveis novos tratamentos contra leishmaniose.

Agradecimentos

Agradeço ao órgão de fomento do projeto, CNPq -Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências

BRASIL, 2017a. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – Editora do Ministério da Saúde, p.12: 29-30, 2017.

DUARTE, C. D. et al. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis Roscoe* against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 21-28, 2016. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489416300522?via%3Dihub>>. Acessado em: 18 jul. 2019, 21:39:23.

LE, T. B et al. In Vitro Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Vietnamese Plants. **Molecules**, V. 22(7), p. 1071, 2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152080/>>. Acessado em: 18 jul. 2019, 21:10:23.

MONZOTE, L et al. In-Vitro Evaluation of 52 Commercially-Available Essential Oils against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 24(7), p.1248, 2019. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480327/>>. Acessado em: 18 jul. 2019, 20:23:50.

RAHMANI, A H et al. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 6(2), p. 125-36, 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106649/>>. Acessado em: 12 jul. 2019, 17:30:30.