

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, ANTITRYPANOSOMA E CITOTÓXICA DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA

Diniara Munhoz Dias<sup>1</sup> (IC/BALCÃO-CNPq), Rodolfo Bento Balbinot<sup>1</sup>, Danielle Lazarin-Bidóia<sup>1</sup>, Wilker Caetano<sup>2</sup>, Tânia Ueda-Nakamura<sup>1</sup>, Celso Vataru Nakamura<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: [cvnakamura@uem.br](mailto:cvnakamura@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / <sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde, <sup>2</sup>Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

### CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III / Microbiologia aplicada

**Palavras-chave:** óleo de copaíba, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp.

#### Resumo:

As leishmanioses cutânea e visceral e a doença de Chagas são doenças negligenciadas causadas pelos protozoários *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Devido às limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, a busca por terapias alternativas vem sendo estudada por cientistas do mundo todo. Estudos com plantas do gênero *Copaifera* estão em ascensão devido a suas atividades farmacológicas já descritas. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a atividade antiproliferativa do óleo de copaíba frente formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania* spp, bem como as citotoxicidades em células de mamíferos. Os resultados obtidos sugerem que o óleo de copaíba é um promissor candidato ao tratamento dessas doenças infecciosas, sendo que a incorporação do óleo em uma formulação farmacêutica poderá torná-lo mais eficaz e menos tóxico.

#### Introdução

Um grande problema enfrentado pelos países tropicais são as doenças tropicais negligenciadas, causadas por agentes infecciosos e que prevalecem nas populações mais pobres, agravando a desigualdade social. Entre elas, encontra-se a leishmaniose, causada por parasitos do gênero *Leishmania*, que apresentam manifestações clínicas específicas, podendo ser cutânea, quando o agente etiológico da doença é a *Leishmania amazonensis*, ou visceral, quando a infecção ocorre pela *L. infantum*. Outra doença negligenciada é a doença de Chagas, uma tripanossomíase causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2012).

Os medicamentos atualmente disponíveis para ambas as enfermidades possuem eficácia limitada, não há vacinas e apenas uma parcela da população tem acesso ao tratamento, que apresenta grande toxicidade e custo elevado (DE SOUZA, 2017). Tendo isso em vista, a pesquisa por terapias inovadoras surge a fim de fornecer à população tratamentos adequados, sendo os produtos naturais uma fonte promissora de recursos. Estudos com plantas do gênero *Copaifera*, endêmicas na região amazônica, popularmente conhecidas como copaíba, vem crescendo cada vez mais devido as diversas propriedades medicinais já descritas, entre elas a

atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiproliferativa (ARRUDA, 2019). Dessa forma, o presente estudo avaliou a atividade antiproliferativa de diferentes óleos resina de copaíba coletados em diferentes regiões e épocas, frente aos protozoários causadores da leishmaniose cutânea, leishmaniose visceral e da doença de Chagas.

## Materiais e métodos

Os óleos resina de copaíba foram coletados em diferentes regiões da Amazônia e épocas variadas, e foram fornecidos pelo Prof. Dr. Wilker Caetano do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/JOSEFA) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração, hemina e ácido fólico, pH 7,2) e formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em meio LIT (infusão de fígado e triptose, pH 7,4). Macrófagos J774A.1 e células LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas em meio RPMI 1640 e DMEM, respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para avaliação da atividade antiproliferativa, formas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* ( $1 \times 10^6$  parasitos mL<sup>-1</sup>) com cultivo de 48 h ou epimastigotas de *T. cruzi* ( $1 \times 10^6$  parasitos mL<sup>-1</sup>) com cultivo de 96 h foram adicionadas em placa de 96 poços estéril, na presença e ausência dos diferentes óleos e incubadas por 72 h ou 96 h, respectivamente. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método do XTT (MESHULAM, 1995), e a concentração inibitória para 50% dos parasitos (CI<sub>50</sub>) foi determinada por regressão não linear.

Para avaliação das citotoxicidades, macrófagos ( $5,0 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) ou LLC-MK<sub>2</sub> ( $2,5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) foram semeados em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos óleos e incubadas novamente por 48 h ou 96 h, respectivamente. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (MOSSMANN, 1983), a porcentagem de morte celular foi calculada com base no controle (células não tratadas), os resultados foram plotados e a concentração citotóxica para 50% das células foi determinada por regressão não linear.

## Resultados e Discussão

Nesse estudo, pode-se perceber que todos os lotes de óleo resina testados apresentaram atividade antiproliferativa, com valores variados entre 26,58 e 41,34 µg mL<sup>-1</sup>, descritos nas **Tabelas 1 e 2**. A melhor atividade encontrada em promastigotas de *L. amazonensis* foi o COP05, com um CI<sub>50</sub> de 28,53 µg mL<sup>-1</sup>. Já em promastigotas de *L. infantum* o óleo resina mais promissor foi o CR1, com um CI<sub>50</sub> de 31,16 µg mL<sup>-1</sup>. A avaliação citotóxica do óleo de copaíba em macrófagos (J774A.1) apresenta o COP04 como mais tóxico, com um CC<sub>50</sub> de 23,52 µg mL<sup>-1</sup>, e o COP05 como menos tóxico, com um CC<sub>50</sub> de 58,54 µg mL<sup>-1</sup>. A citotoxicidade do óleo resina foi comparada com a atividade antiproliferativa em promastigotas através do índice de seletividade (IS), calculado pela razão entre o CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>. Considera-se mais seletivo para o parasito quando é obtido um valor acima de 1. O COP05 teve o

maior índice de seletividade em ambas as espécies de promastigotas, sendo duas vezes mais tóxico para a *L. amazonensis* do que para os macrófagos. Em contrapartida, o COP04 não se mostrou seletivo em promastigotas, visto que a razão encontrada é menor que 1. O CM1 apresentou seletividade para *L. amazonensis* (1,15) porém não se observou o mesmo para *L. infantum* (0,87) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Avaliação da atividade antileishmania e citotóxica de diferentes óleos resina de copaíba.

Óleo resina	<i>L. amazonensis</i> CI <sub>50</sub> ± DP (µg mL <sup>-1</sup> )	<i>L. infantum</i> CI <sub>50</sub> ± DP (µg mL <sup>-1</sup> )	J774A.1 CC <sub>50</sub> ± DP (µg mL <sup>-1</sup> )	IS La	IS Li
<i>C. multijuga</i> (CM1)	39,70 ± 1,39	34,13 ± 3,00	39,54 ± 6,45	0,87	1,15
<i>C. reticulata</i> (CR1)	38,40 ± 2,57	31,16 ± 2,43	44,72 ± 5,22	1,16	1,43
<i>C. reticulata</i> (CR2)	37,21 ± 0,96	35,06 ± 3,05	43,83 ± 3,29	1,17	1,25
<i>C. reticulata</i> (COP238)	36,06 ± 3,19	36,05 ± 1,13	50,46 ± 2,68	1,39	1,39
<i>C. reticulata</i> (COP02)	40,64 ± 2,87	37,10 ± 3,43	44,80 ± 2,12	1,10	1,20
<i>C. reticulata</i> (COP04)	35,82 ± 3,38	37,75 ± 3,82	23,52 ± 2,14	0,65	0,62
<i>C. reticulata</i> (COP05)	28,53 ± 4,61	37,15 ± 1,08	58,54 ± 7,13	2,05	1,57

CI<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% dos parasitos. CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica para 50% das células. IS: índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>).

O mesmo processo de avaliação foi realizado em epimastigotas de *T. cruzi*. A atividade antiTrypanosoma mais promissora foi representada pelo óleo resina CR1, com um CI<sub>50</sub> de 26,58 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto o CR2 obteve o resultado menos efetivo, com um CI<sub>50</sub> de 41,34 µg mL<sup>-1</sup>. A citotoxicidade em células LLC-MK<sub>2</sub> indica o COP05 como menos tóxico, com um CC<sub>50</sub> de 64,75 µg mL<sup>-1</sup>, e o CM1 como mais tóxico, com um CC<sub>50</sub> de 41,79 µg mL<sup>-1</sup>. Ao analisar o índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>), observa-se que todos os óleos resina se mostraram seletivos para o protozoário, com valores variando entre 1,07 e 1,69, sendo o IS mais alto proveniente do COP05 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Avaliação da atividade antiTrypanosoma e citotóxica de diferentes óleos resina de copaíba.

Óleo resina	<i>T. cruzi</i> CI <sub>50</sub> ± DP (µg mL <sup>-1</sup> )	LLC-MK <sub>2</sub> CC <sub>50</sub> ± DP (µg mL <sup>-1</sup> )	IS
<i>C. multijuga</i> (CM1)	37,11 ± 3,30	41,79 ± 4,16	1,12
<i>C. reticulata</i> (CR1)	26,58 ± 2,50	44,02 ± 3,92	1,65
<i>C. reticulata</i> (CR2)	41,34 ± 3,47	54,90 ± 2,85	1,32
<i>C. reticulata</i> (COP238)	34,68 ± 1,14	49,29 ± 4,16	1,42
<i>C. reticulata</i> (COP02)	40,60 ± 3,44	46,53 ± 6,60	1,07
<i>C. reticulata</i> (COP04)	37,73 ± 3,19	46,12 ± 4,13	1,22

*C. reticulata* (COP05) 38,21 ± 4,23 64,75 ± 4.33 1,69

CI<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% dos parasitos. CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica para 50% das células. IS: índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>).

### Conclusões

Os resultados obtidos indicam que o óleo de copaíba apresentou promissora atividade antiproliferativa e tem potencial para ser um futuro tratamento alternativo de doenças parasitárias como a leishmaniose e a doença de Chagas. Porém, ainda é necessário o desenvolvimento de uma formulação com maior eficácia e menor toxicidade para viabilizar seu uso em pacientes acometidos por essas patologias.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq por financiar o projeto, ao laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos por permitir a realização do estudo, e aos pesquisadores do laboratório por todo o auxílio.

### Referências

ARRUDA, C.; MEJÍA, J. A. A.; RIBEIRO, V. P.; BORGES, C. H. G.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1-20, 2019.

DE SOUZA, C. E. S.; DA SILVA, A. R. P.; GOMEZ, M. C. V.; ROLÓM, M.; CORONEL, C.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Anti-Trypanosoma, anti-Leishmania and cytotoxic activities of natural products from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. and *Psidium guajava* var. *Pomifera* analysed by LC-MS. **Acta Tropica**, v. 176, p. 380-384, 2017.

MESHULAM, T.; LEVITZ, S. M.; CHRISTIN, L.; DIAMOND, R. D. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 4, p. 1153-1156, 1995.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis**. World Health Organization, 2012.

Código de campo alterado