

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CITOTÓXICA DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO CONTENDO O ÓLEO RESINA DE COPAÍBA.

Diniara Munhoz Dias¹ (IC/BALCÃO-CNPq), Rodolfo Bento Balbinot¹, Danielle Lazarin-Bidóia¹, Katieli da Silva Souza Campanholi², Wilker Caetano², Celso Vataru Nakamura¹ (Orientador), e-mail: cvnakamura@uem.br

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

CIÊNCIAS DA SAÚDE / Microbiologia aplicada

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

Resumo:

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* que atinge milhões de pessoas no mundo todo. Devido às limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, como a alta toxicidade e custo elevado, a busca por terapias alternativas vem sendo estudada por cientistas do mundo todo. Nesse contexto, estudos com plantas do gênero *Copaifera* e seu uso em sistemas de fármacos com liberação controlada estão em ascensão devido a suas promissoras atividades farmacológicas já descritas. Assim, o presente estudo utilizou diferentes formulações de uso tópico contendo óleo de copaíba, tendo como objetivo avaliar sua atividade antiproliferativa frente a protozoários da espécie *Leishmania amazonensis* e citotóxica em macrófagos J774A.1. Todas as formulações tópicas testadas apresentaram atividade antiproliferativa, com valores variados entre 466,30 e 757,68 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, a formulação F3 que mostrou melhor atividade antiproliferativa ($\text{CI}_{50} = 466,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também apresentou maiores valores de citotoxicidade ($\text{CC}_{50} = 291,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Com isso, os resultados obtidos mostram que ainda é necessário a busca de uma formulação eficiente e com baixa toxicidade para continuidade dos estudos.

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, que afeta aproximadamente 15 milhões de pessoas ao redor do mundo. Causada por diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, a doença apresenta manifestações clínicas específicas, podendo ser cutânea, mucocutânea e visceral, das quais a

leishmaniose cutânea é responsável por 1 milhão de novos casos por ano, sendo a forma clínica mais comum atualmente (WHO, 2021).

A leishmaniose é transmitida por fêmeas do inseto *Lutzomyia* através do repasto sanguíneo, em que são inoculadas formas promastigotas do parasito no hospedeiro vertebrado. Essas promastigotas são fagocitadas e se diferenciam em formas amastigotas, presente no tecido do hospedeiro (NEVES, 2016).

Não há vacinas aprovadas para o uso humano e os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença possuem eficácia limitada e apenas uma parcela da população tem acesso, visto que apresenta grande toxicidade e custo elevado (SALEEM, 2019). 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, vêm crescendo cada vez mais devido às diversas propriedades medicinais já descritas, entre elas a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiproliferativa (ARRUDA, 2019). A necessidade do desenvolvimento de uma intervenção terapêutica eficaz e segura faz com que cresçam os estudos com sistemas de liberação controlada de fármacos, possibilitando a ação local do princípio ativo do medicamento, e consequentemente reduzindo os efeitos adversos (SALEEM, 2019). Entre as possíveis formas farmacêuticas de liberação controlada, os sistemas nanoestruturados termoresponsivos se mostram como uma alternativa para o tratamento de doenças como a leishmaniose. Dessa forma, o presente estudo avaliou a atividade antiproliferativa de diferentes formulações de uso tópico contendo o óleo resina de copaíba frente a protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*.

Materiais e métodos

As formulações semissólidas foram produzidas utilizando concentrações diferentes do óleo resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata*, coletada na Amazônia e fornecida pelo Prof. Dr. Wilker Caetano do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração, hemina e ácido fólico, pH 7,2) e macrófagos J774A.1 foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidos a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Para avaliação da atividade antiproliferativa, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos mL⁻¹) com cultivo de 48 h foram adicionadas em placa de 96 poços estéril, na presença e ausência das diferentes formulações e incubadas por 72 h. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método do XTT, e a concentração inibitória para 50% dos parasitos (CI₅₀) foi determinada por regressão não linear.

Para avaliação da citotoxicidade, macrófagos ($5,0 \times 10^5$ células mL⁻¹) foram semeados em placas de 96 poços e mantidos a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações das formulações e incubadas novamente por 48 h. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, 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

As formulações semissólidas da *C. reticulata* foram codificadas em F1, F3 e F5, com 8, 12 e 10% de óleo resina de copaíba em cada uma delas, respectivamente. A avaliação da atividade antiproliferativa foi feita em diluição seriada nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125 µg.mL⁻¹. Além disso, testou-se apenas a parte polimérica da formulação para avaliação da toxicidade, sendo chamada de BR.

Nesse estudo, pode-se perceber que todas as formulações tópicas testadas apresentaram atividade antiproliferativa, com valores variados entre 466,30 e 757,68 µg.mL⁻¹, conforme descrito na **Tabela 1**. Em um panorama geral, a melhor atividade encontrada em promastigotas de *L. amazonensis* foi o F3, com um CI₅₀ de 466,30 µg.mL⁻¹. A avaliação citotóxica do óleo de copaíba em macrófagos (J774A.1) apresenta o F3 como mais tóxico, com um CC₅₀ de 291,05 µg.mL⁻¹, e o F1 como menos tóxico, com um CC₅₀ de 348,71 µg.mL⁻¹. A citotoxicidade do óleo resina foi comparada com a atividade antiproliferativa em promastigotas através do índice de seletividade (IS), calculado pela razão entre o CC₅₀/CI₅₀. Considera-se mais seletivo para o parasito quando é obtido um valor acima de 1. De acordo com os dados obtidos, nenhuma das formulações se mostrou seletiva para o protozoário.

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

Formulação	<i>L. amazonensis</i>	J774A.1	IS
	CI ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)	CC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)	
F1	757,68 ± 11,43 (60,61 ± 0,91)	348,71 ± 12,42 (27,90 ± 0,99)	0,46
F3	466,03 ± 41,62 (55,92 ± 4,99)	291,05 ± 37,13 (34,93 ± 4,46)	0,62
F5	534,68 ± 66,16 (53,47 ± 6,62)	316,18 ± 25,05 (31,62 ± 2,50)	0,59
BR	>2000	>1000	-

CI₅₀: concentração inibitória para 50% dos parasitos. CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células. IS: índice de seletividade (CC₅₀/CI₅₀). Resultados expressos em relação à concentração total da formulação e entre parênteses a concentração relativa de óleo resina.

Considerando que a formulação contendo apenas o polímero não apresentou toxicidade nas concentrações testadas tanto para o protozoário quanto para a célula, pode-se afirmar que a atividade descrita provém da fração de óleo da nanoestrutura avaliada. Isso explica a melhor atividade antiproliferativa observada em F3, que, por ter uma porcentagem maior do princípio ativo permite o uso de uma quantidade menor de polímero para obter o mesmo efeito observado nas formulações com concentrações menores do óleo.

Estudos prévios descrevem o óleo de copaíba com uma baixa citotoxicidade e alto índice de seletividade para o parasito (SANTOS, 2008) divergindo dos resultados observados nas análises realizadas. Pressupõe-se que estudos em modelos *in vivo* sejam mais adequados para a avaliação da toxicidade celular, visto que são formulações de uso tópico, o que dificulta a simulação real de um efeito através de cultura de células.

Conclusões

Por apresentar uma promissora atividade antiproliferativa contra a *Leishmania* spp. em estudos prévios, o óleo de copaíba pode representar um possível adjuvante no tratamento de leishmaniose cutânea. Ainda assim, é necessário que sejam realizados mais estudos a fim de elaborar uma formulação com maior eficácia e menor toxicidade, possibilitando o uso futuro em pacientes acometidos por essa doença.

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. *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 109, p. 1-20, Jan, 2019.

NEVES, D.P., *et al.* Parasitologia Humana. 13ª Edição, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2016.

SALEEM, K. *et al.* Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges. **Nanomaterials**, Basel, v. 9, n. 12, p. 1749, 2019.

SANTOS, A. O. *et al.* Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em 30 Aug 2021.