

**O efeito dos óleos essenciais de *Myrcia ovata* Cambess. (Myrtaceae) e *Eremanthus erytropappus* (DC.) Macleish. (Asteraceae) sobre *Leishmania amazonensis*.**

**Rafaela Fontes da Silva<sup>1</sup>, Tulio Vieira dos Santos<sup>1</sup>, Karina Martins Cardoso<sup>2</sup> & Patrícia Fampa<sup>3</sup>.**

1- Bolsistas PROIC, Discentes do Curso de Ciências Biológicas, IB/UFRRJ; 2- Mestranda da Pós-Graduação em Bioquímica Médica IBQM/UFRRJ; 3- Professora do DBA/IB/UFRRJ.

*Palavras-chave:* leishmanioses, óleos essenciais; quimioterapia.

### **Introdução**

Os protozoários do gênero *Leishmania* (Família: Trypanosomatidae) são protozoários heteróxicos, necessitando de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar o seu ciclo de vida. Apresentam duas formas durante o seu ciclo de vida: uma extracelular, presente no inseto-vetor, denominada promastigota e uma forma amastigota intracelular no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (BATES, 2007). As leishmanioses compreendem um grupo de doenças que podem se apresentar com quatro manifestações clínicas distintas, dependendo da espécie do parasita (tegumentar cutânea, tegumentar cutânea difusa, tegumentar mucocutânea e visceral). Ainda hoje, esse grupo de doenças se encontra na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS). Dados recentes indicam que as leishmanioses ocorrem em 98 países de 5 continentes. No Brasil, as leishmanioses apresentam elevada incidência. (ALVAR et al., 2012). A leishmaniose cutânea é caracterizada por úlceras rasas ou profundas, geralmente uma única lesão. Uma variação da forma cutânea é a leishmaniose cutânea-difusa que não responde ao tratamento medicamentoso habitual, sendo por isso extremamente grave. Uma espécie epidemiologicamente importante causadora das formas cutânea e cutânea-difusa nas Américas é a *L. amazonensis*. Os antimoniais pentavalentes, como Pentostam® e Glucantime® são os medicamentos considerados de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, entretanto, esses fármacos também possuem toxicidade elevada e alto custo. Os produtos naturais constituem uma importante e possível fonte de compostos úteis para o tratamento e controle de diferentes doenças infecciosas. A utilização popular de óleos essenciais no tratamento de leishmanioses tem sido relatada (KVIST, L. P., et al, 2006). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é testar a ação dos óleos essenciais OELM de *Myrcia ovata* Cambess. (Myrtaceae), popularmente conhecida como laranjinha-do-mato, cujo componente principal é o citral e OEC de *Eremanthus erytropappus* (DC.) Macleish. (Asteraceae), popularmente conhecida como candeia, cujo componente majoritário é o  $\alpha$ -bisabolol contra *L. amazonensis* nas suas formas promastigotas e amastigotas.

### **Metodologia**

**Atividade anti-promastigota:** Promastigotas de *L. amazonensis* ( $2 \times 10^5$  em 200  $\mu$ L) foram incubadas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, na presença ou não dos óleos essenciais adicionados no primeiro dia de cultivo. A sobrevivência dos parasitos foi estimada através da contagem dos parasitos viáveis/móveis em câmara de Neubauer durante quatro dias consecutivos.

**Atividade anti-amastigota:** Macrófagos aderidos em lamínulas foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (4 dias de cultura) em uma proporção de parasita:macrófago de 5:1 e incubados por 2 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os parasitos não aderidos foram removidos através de lavagens de PBS a 37°C e as culturas incubadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone). Após 24 horas de interação a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> a cultura foi tratada com diferentes concentrações dos óleos essenciais. Após 96 horas nas mesmas condições descritas acima, as células foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas com metanol (100%) e coradas com Giemsa. O índice de associação (% de macrófagos infectados x número médio de amastigota por macrófago) foi determinado microscopicamente através da contagem de no mínimo 200 células em duplicata.

**Método do XTT:** Macrófagos foram plaqueados em placa de 96 poços (2x10<sup>5</sup>/poço) e incubados a 37°C/5% CO<sub>2</sub> com meio RPMI com 10% SFB por. Após esse período, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações dos óleos essenciais por 24 horas a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Após os tratamentos, os macrófagos foram lavados e incubados com PBS contendo 1.48 mM XTT (2,3-Bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt, Sigma) ativado com 200mM de PMS (Phenazine Methosulfate, Sigma). Após 3 horas de incubação, o produto dessa reação foi lido e a atividade mitocondrial das células foi determinada a 450nm (Microplate Reader Mod. 3550-UV, Bio-Rad Laboratories). Os resultados foram expressos em percentagem de sobrevivência em relação aos controles não tratados em triplicata.

**Análise ultraestrutural** Promastigotas tratados e não tratados com os óleos essenciais foram lavados em PBS e fixados por 1 hora com 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato, pH 7,2. Após repetidas lavagens em 0,1M de tampão cacodilato, as células foram pós-fixadas em solução de 0,1M de tampão cacodilato, contendo 5mM de cloreto de cálcio, 0,8 mM de ferricianeto de potássio e 1% de tetróxido de ósmio por 40 minutos a temperatura ambiente. As células foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona. O material foi emblocado em Epon. Secções finas foram obtidas em ultramicrotomo, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

## Resultados

**Efeito dos óleos no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*-** Nossos resultados demonstraram que os óleos essenciais OELM e OEC apresentaram efeito em promastigotas, onde o IC<sub>50</sub> após 4 dias de tratamento foi 8,69 µg/mL e 9,53 µg/mL, respectivamente.

**Efeito dos óleos na viabilidade da célula hospedeira-** OELM apresenta certa toxicidade para os macrófagos a partir de concentrações medianas enquanto que OEC somente nas concentrações mais altas com CC<sub>50</sub> de 16,5 µg/mL e 29,2 µg/mL, respectivamente.

**Efeito dos óleos essenciais sobre as formas amastigotas intracelulares do parasita-** Observamos que os óleos essenciais OELM e OEC levam a uma redução de cerca de 4,5 vezes no Índice de Associação da infecção de macrófagos com *L. amazonensis*, o que indica que afetam as formas amastigotas intracelulares e infectivas do parasita.

**Alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis*-** Promastigotas tratados com diferentes concentrações e por diferentes tempos com OELM e OEC apresentaram alterações morfológicas em relação ao controle não tratado, tais como inchaço mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos e alterações no nucléolo.

## Conclusões

- 1- Os óleos essenciais OELM e OEC testados afetam o crescimento de formas promastigotas de forma dose dependente. Além disso, análises ultraestruturais dessas formas tratadas mostram que os óleos acarretam alterações morfológicas importantes nos parasitas que devem refletir em alterações fisiológicas;
- 2- Os óleos essenciais OELM e OEC não comprometem a viabilidade dos macrófagos de forma significativa, mas afetam a sobrevivência das formas amastigotas dos parasitas no interior dessa célula hospedeira. Pretendemos aprofundar nossos estudos para entender se os óleos agem diretamente sobre os amastigotas ou ativando os mecanismos microbicidas dos macrófagos.

## Referências Bibliográficas

- ALVAR, J; et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**. 2012. The WHO Leishmaniasis Control Team.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigote by phlebotomine sand flies. **Int. J. for Parasitol.**, 2007. 37: 1097-1106.
- KVIST, L. P., CHRISTENSEN, S. B., RASMUSSEN, H. B., MEJIA, K., GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal Ethnopharmacology**. 2006. 19;106 (3), 390-402.