

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia piauhiensis* Vellaf CONTRA AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum*

¹Jose Whesley Rodrigues de Lucena; ¹Douglas Soares de Oliveira; ¹Mercya Lopes Braga; ²Maria Gabrielly Gonçalves da Silva Sousa; ³Julyanne Maria Saraiva de Sousa; ⁵Klinger Antônio da Franca Rodrigues.

¹ Graduando em Biomedicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr;
² Biomédica e Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr; ³ Biomédica e Doutoranda em Biotecnologia pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr; ⁵ Prof. Dr. do curso de Medicina pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr.

Área temática: Biotecnologia e Inovação em Saúde

Modalidade: Comunicação Oral Presencial

E-mail dos autores: whesleyrodrigues@ufdpar.edu.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: As Leishmanioses são doenças parasitárias, incluídas no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas, afetando a população socioeconomicamente desfavorecida e enfrentando desafios no desenvolvimento de métodos terapêuticos eficazes. Acometendo mais de 12 milhões de indivíduos globalmente. O tratamento atual, com fármacos de referência, enfrenta desafios de toxicidade e resistência, levando à busca por novas alternativas terapêuticas como o óleo essencial de *Eugenia piauhiensis* Vellaf. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial antileishmaniano do óleo essencial de *Eugenia piauhiensis* Vellaf contra as formas infectantes (promastigotas) da *Leishmania (Leishmania) infantum*. **MÉTODOS:** O óleo essencial foi extraído das folhas da espécie *Eugenia p. Vellaf*. Os parasitos utilizados foram da espécie *Leishmania infantum*, cultivados em meio de Schneider suplementado e colocados em placas de cultivo celular com 96 poços. Em seguida, soluções da nanoemulsão foram adicionadas aos poços e incubou-se as placas em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) em temperatura de 26°C por 72 horas. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em uma placa de 96 poços contendo meio RPMI, macrófagos murinos e diferentes concentrações das substâncias e incubados por um período de 72 horas e avaliados pelo ensaio de MTT. **RESULTADOS:** Os resultados obtidos evidenciam que o óleo essencial de *Eugenia p. Vellaf* (OEEU) apresenta um potencial significativo como fármaco contra as formas promastigotas de *L. infantum*, demonstrado pelo IC₅₀ (16,73) e CC₅₀ (324,62). Em comparação com os fármacos de referência Anfotericina B e Antimonial de Meglumina, o OEEU mostra-se menos citotóxico e mais seletivo, com um Índice de Seletividade (IS) de 19,40, sendo 17,47 e 28,58 vezes mais seletivo que esses fármacos, respectivamente. **CONCLUSÃO:** O óleo essencial de *Eugenia p. Vellaf* apresentou potencial antileishmaniano significativo contra formas promastigotas de *L. infantum*, em modelo in vitro, apresentando melhor seletividade em comparação aos tratamentos atuais. Estudos adicionais são necessários para avaliar sua eficácia intracelular.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Eugenia piauhiensis*; *Leishmania infantum*.

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças parasitárias, que estão incluídas no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Representam um conjunto de enfermidades heterogêneas, caracterizadas pela sua prevalência em populações em condições socioeconômicas desfavoráveis. Devido à sua baixa visibilidade e à limitada capacidade de investimento por parte das indústrias farmacêuticas, o combate as leishmanioses enfrentam desafios no desenvolvimento de métodos terapêuticos e preventivos que sejam eficazes, seguros e acessíveis (Luna; Campos, 2020).

Conforme a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em sua mais recente publicação datada de 21 de dezembro de 2023, evidenciou a notificação de 12.878 novos casos no Brasil durante o ano de 2022. Este agravamento afeta mais de 12 milhões de indivíduos em escala global, ademais, estimasse que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo um importante problema de saúde pública (OPAS, 2022).

Esta enfermidade pode manifestar-se de várias formas clínicas, dependendo da espécie do parasito envolvido e de fatores inerentes ao hospedeiro, entre outros fatores. A mais comum forma encontrada da leishmaniose é a tegumentar, que pode ainda se dividir em: cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa e mucocutânea. O segundo grupo é a leishmaniose visceral, caracterizada pelo acometimento de órgãos internos como medula óssea e principalmente fígado e baço, devido a isso é a forma mais mortal (Rodin; Smirnov, 2020; Volpedo *et al.*, 2021).

O agente etiológico dessa enfermidade é um parasita dimórfico com uma fase intracelular obrigatório pertencente à ordem Kinetoplastida e ao gênero *Leishmania*. O protozoário de morfologia unicelular é transmitido ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo de vetores fêmeas de *Lutzomyia*, sendo assim caracterizado por um ciclo heteroxênico (Thakur *et al.*, 2022). Esses protozoários possuem duas principais morfologias, as amastigotas, encontradas dentro das células dos hospedeiros vertebrados e a segunda morfologia, as promastigotas, forma flagelada cujo sua principal localização é dentro do tubo digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, sendo essa última a forma infectante para os mamíferos (Mazzinghy *et al.* 2021).

A terapêutica ocorre através da administração de fármacos, dentre eles os antimonial pentavalentes e a anfotericina B. Contudo, essa abordagem encontra-se confrontada por uma série de desafios, incluindo a necessidade de administração parenteral, alto custo e a ocorrência de elevada toxicidade hepática e cardíaca (Carnielli *et al.*, 2019). Devido aos problemas causados por esses

fármacos, há um aumento do número de pacientes que desistem do tratamento, levando a um surgimento de cepas resistentes. Em virtude desses agravos, torna-se necessário a busca por métodos de tratamento com maior eficácia e com menos agravos a saúde (Peixoto *et al.*, 2024; OPAS, 2022).

Os óleos essenciais, ao longo dos anos, esses compostos têm sido explorados na medicina alternativa devido ao seu perfil consideravelmente menos agressivo à saúde humana. O gênero *Eugenia* abriga uma variedade de espécies no qual seu óleo essencial é composto por mais de 300 substâncias, com predominância de sesquiterpenos e monoterpenos. Distribuídas por todo o território brasileiro, este gênero tem sido objeto é bastante alvo de pesquisa devido às suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias (Flora do Brasil, 2020).

Nesse contexto, o presente estudo propôs investigar a nanoemulssão do OE extraído da *Eugenia piauhiensis* Vellaf, visando avaliar suas propriedades antiparasitárias e a citotoxicidade em macrófagos.

2 MÉTODO

2.1. Coleta e identificação botânica

Para a extração do óleo essencial, foram coletadas folhas da espécie *Eugenia p.* Vellaf no jardim residencial do Bairro Reis Velloso, no município de Parnaíba, Piauí. Ramos floridos e a exsicata foram coletados e enviados ao Herbário do Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Piauí para a devida identificação botânica.

2.2. Extração do óleo essencial

Utilizou-se um aparelho de Clevenger acoplado a um balão de destilação de fundo chato com capacidade para 6 litros. Foram adicionados 100 g de amostra vegetal (Folhas secas ao ar (40°)) juntamente com água destilada, mantendo-se a proporção de 1:10. O sistema foi aquecido em uma manta de aquecimento, e a destilação foi conduzida por 4 horas, a partir do momento em que a primeira gota de óleo foi obtida. O óleo essencial foi coletado e acondicionado em um frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado (Nunes *et al.*, 2022).

2.3. Cultivo dos Parasitos e células

Foram utilizados parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), cultivados em meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (10.000 U/10 mg) a 26°C e pH 7 mantidos em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD), segundo a metodologia de Nunes *et al.*, (2022).

Os macrófagos RAW 264.7, fornecida e cultivadas no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC), foram armazenados em frascos de cultura contendo meio DMEM completo (10% SFB, 1 % de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (pH 7) a 37 °C, 5% de CO₂ (Nunes *et al.*, 2022).

2.4. Avaliação da inibição do crescimento de formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. infantum* (em fase logarítmica de crescimento), foram cultivadas em placas de cultivo celular com 96 poços contendo meio Schneider suplementado, na quantidade de 1 x 10⁶ parasitos por poço. Em seguida, soluções da OEEU foram adicionadas aos poços, em diluições seriadas de 400 a 0,78 µg/mL. Seguindo, incubou-se as placas em BOD a temperatura de 26°C por 72 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 540 nm (Nunes *et al.*, 2022).

2.5. Ensaio de citotoxicidade

Em uma placa de 96 poços foram colocados 100 µL meio RPMI 1640 e 1 x 10⁶ de macrófagos murinos 264.7 por poço. Após 4 h de incubação para adesão celular realizou-se três lavagens com PBS estéril. Em continuidade, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações do OE e incubados por um período de 72 horas. No final do período foi aplicado 10 µL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2y l)-2,5-difenil tetrazolium]) e incubado por mais de 4 h. Logo após aplicação do DMSO para solubilizar formazan. Em seguida, a leitura foi realizada a 540 nm em uma leitora de placa (Nunes *et al.*, 2022).

3 RESULTADOS

3.1. Avaliação da atividade antileishmania do OEEU sobre formas promastigotas de *L. infantum*

Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 1, o OEEU mostrou atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania infantum*, tendo em vista o valor de CI₅₀ (concentração inibitória média) obtido de 16,73. Apresentou melhor resultado quando comparado com os fármacos de referência utilizados nesse estudo (Antimonial de Meglumina) com CI₅₀ de 2150.

3.2. Citotoxicidade e IS do OEEU sobre macrófagos RAW 264.7

Após o período de tratamento de 72 horas, foi realizado o ensaio de MTT e calculado o CC₅₀ (concentração de citotoxicidade média) de 324,62 µg/mL para macrófagos RAW 264.7 tratados com OEEU, indicando uma baixa citotoxicidade. Em comparação, a anfotericina B apresentou uma CC₅₀ de 0,39 µg/mL, demonstrando alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. Tendo em vista os

resultados obtidos, O OEEU mostrou-se 17,47 vezes mais seletivo que a Anfotericina B e cerca de 28,25 vezes mais seletivo que o Antimonial de Meglumina.

Tabela 1 - Atividade anti-Leishmania e efeito citotóxico em frente a células RAW 264.7 e valores do índice de seletividade (IS) calculados para os óleos essenciais de *Eugenia piauhiensis*.

Compostos	RAW 264.7	Promastigotas	
	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	IS
OEEU	324,62	16,73	19,40
Anfotericina B	0,39	0,35	1,11
Antimonial de Meglumina	15863	2150	0,73

Fonte: Elaboração própria

* Índice de Seletividade = CC₅₀ / CI₅₀

4 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais extraídos da Família Myrtaceae, como no trabalho de Michelon *et al.*, (2020) que apresenta o OE de *Eugenia pyriformis* com atividade promissória contra *Leishmania*, têm sido descritos como potenciais candidatos antiparasitários devido à presença de substâncias com fortes propriedades microbidas. Outro exemplo é o estudo de Nunes *et al.*, (2021), que corrobora os resultados aqui apresentados.

O OEEU demonstrou ser um forte candidato para um tratamento mais assertivo e com menos prejuízos ao paciente. De acordo com pesquisas, um índice de seletividade (IS) maior que 10 é considerado como bom (Njeru; Muema, 2021), o que é demonstrado nesse trabalho, por outra vertente os tratamentos padrão usados como a Anfotericina B com IS de 1,11 e Antimonial de Meglumina de 0,73 são as possíveis causas dos efeitos colaterais tais eles como a hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite e arritmias cardíacas (Sousa *et al.*, 2023).

O composto testado inibe as formas promastigotas, ou seja, as morfologias infectantes em uma baixa concentração e ainda é mais seletivo como visto anteriormente, sendo importante para evitar os possíveis efeitos colaterais, uma vez que tem uma melhor distinção entre o parasito e as células do hospedeiro. Tal perspectiva deixa uma grande proposta para uma investigação mais detalhada.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, fica evidente que o óleo essencial de *Eugenia p. Vellaf* (OEEU) apresenta um potencial significativo como fármaco contra as formas promastigotas de *L. infantum*, demonstrado pelo IC₅₀ e CC₅₀ apresentando-se como um candidato promissor a aprofundamento em estudos *in vitro* contra formas amastigotas e futuros estudos *in vivo* podendo tornar-se um candidato promissor ao tratamento das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- CARNIELLI, J. B. T. et al. Natural resistance of *Leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789–794, 2019
- Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 de agosto de 2024.
- LUNA, E. J. DE A.; CAMPOS, S. R. DE S. L. DA C. O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. **Cadernos de saude publica**, v. 36, n. suppl 2, p. e00215720, 2020.
- MAZZINGHY, C. et al. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **PubVet**, v. 15, n. 03, 2021.
- MICHELON, A. et al. ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE EXTRATOS DE UVAIA (*EUGENIA PYRIFORMIS*) SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 57178–57184, 2020.
- NJERU, S. N.; MUEMA, J. M. In vitro cytotoxicity of *Aspilia pluriseta* Schweinf. extract fractions. **BMC research notes**, v. 14, n. 1, 2021.
- NUNES, T. A. DE L. et al. *Eugenia piauhiensis* Vellaff. Essential oil and γ -elemene its major constituent exhibit antileishmanial activity, promoting cell membrane damage and in vitro immunomodulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 339, p. 109429, abr. 2021.
- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição**. Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em: . Acesso em: 13 de Fev. de 2024.
- PEIXOTO, J. F. et al. Efficacy of the treatment using a microemulsion loaded with epoxy- α -lapachone in combination with meglumine antimoniate against murine infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **International journal for parasitology, drugs and drug resistance**, v. 24, n. 100525, p. 100525, 2024.
- RODIN, A. J.; SMIRNOV, A. V. Leishmaniasis. Epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Journal of Volgograd State Medical University**, v. 17, n. 1, p. 181–183, 2020.
- SOUSA, J. P. A. DE et al. Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International immunopharmacology**, v. 123, n. 110750, p. 110750, 2023.
- THAKUR, L. et al. An insight into systemic immune response in *Leishmania donovani* mediated atypical cutaneous leishmaniasis in the new endemic state of Himachal Pradesh, India. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2022.
- VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021.