



ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ÉTER *N*-BUTIL DILAPIOL DE *PIPER ADUNCUM* L. (PIPERACEAE)

MIRLEN LIMA DE ALMEIDA; ANGELA MARIA COMAPA BARROS; EMERSON SILVA LIMA; ANA CRISTINA DA SILVA PINTO; ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO

RESUMO

Introdução: a Leishmaniose é um problema de saúde pública e exemplo de doença negligenciada. Os medicamentos utilizados atualmente apresentam graves efeitos tóxicos. **Objetivo:** estudar a atividade antileishmania e citotóxica do éter *n*-butil dilapiol (EBD) obtido por semissíntese. **Materiais e métodos:** o EBD foi obtido por semissíntese. Para o experimento foi utilizada a espécie de *L. amazonensis*, nas formas promastigotas, numa concentração de 10^6 parasitos. mL⁻¹, expostos a concentrações de 0,2812 a 18 µM do EBD, por 24, 48 e 72 h. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humano foram obtidas de indivíduos saudáveis, isoladas e cultivadas em meio RPMI suplementado a 20% de SFBi a 37 °C a 5% CO₂, ajustada em câmara de Neubauer para 10^6 céls. mL⁻¹ e expostas ao EBD em concentrações de 7,8 a 500 µM por 48 h. Os controles positivos foram a Pentacarinat[®] e Glucantime[®] e o negativo, o DMSO a 0,2%. Quanto a taxa de infecção, utilizou-se uma concentração de 36 µM das substâncias já citadas. **Resultados:** O EBD apresentou uma concentração citotóxica 50% (CC50) de 350 µM, a Pentacarinat[®] de 188,2 µM. Já o Glucantime[®] e o Dilapiol não foi possível obter a CC50. A cerca da inibição da *L. amazonensis*, o EBD inibiu os parasitas viáveis, numa concentração inibitória 50% (CI50) de 3,0; 3,2 e 3,0 µM e a Pentacarinat[®] com uma CI50 de 3,4; 3,0 e 2,9 respectivamente, conforme o tempo. Em relação a eficácia do EBD nas formas intracelulares por 24 h, o EBD mostrou uma atividade similar aos farmacoterapia padrão, apresentando um $P < 0,0001$, quando comparado com DMSO 0,2%. Já em 48 h, o EBD inibiu os amastigotas em 65.5%, similar ao Glucantime[®] (61%). **Conclusão:** o EBD mostrou atividade contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Mas, há a necessidade de investigar em testes *in vivo*, no intuito de desenvolver uma formulação para farmacoterapia da LTA.

Palavras-chave: Semissíntese; Biotecnologia; *Leishmania*.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é um problema de saúde pública e considerada negligenciada, devida a falta de interesse por parte do governo e a indústria farmacêutica em investir em novas farmacoterapias (BRASIL, 2017). Causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae, que acomete pele e mucosas (OMS, 2013).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) está distribuída em 88 países, que abrange os cinco continentes (Américas, Europa, África, Ásia e Oceania) (Alvar, *et al.*, 2012). Segundo a OPAS/OMS (2017), foram notificados 843.931mil novos casos de *Leishmania*

cutânea nas Américas, no período de 2001 a 2015, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. No Brasil, a incidência da LTA apresenta um registro anualmente de 0,7 a 1,3 milhão de casos (OMS, 2017), e sua ocorrência está praticamente em todos os estados da federação (BRASIL, 2017). Apesar dos esforços e investimentos aplicados na pesquisa para o desenvolvimento de novas farmacoterapia para as leishmanioses nos últimos anos, ainda está restrito a poucas opções, além de apresentar elevada toxicidade (OMS, 2013).

Uma das alternativas de obtenção de bioativos, seria por meio das plantas, pois elas já eram utilizadas para fins medicinais pelos povos mais antigos para a cura de várias doenças (Lopes et al. 2018). Atualmente têm-se investido em moléculas provenientes de plantas, já que delas pode-se obter uma diversidade de bioativos metabólicos secundários. Pode-se citar diversos exemplos, como: *Piper strigosum* e *P. pseudoarboreum* considerados fontes potenciais de compostos leishmanicidas (Vasquez-Ocmín et al. 2021), assim como, *Piper aduncum*, rico em dilapiol, um fenilpropanóide com propriedades anti-helmíntica, inseticida e antimicrobiana (Menezes, 2018). Ademais, estudo de Parise-Filho et al. (2012) demonstraram que o dilapiol e dois de seus derivados (di-hidro dilapiol e isodilapiol) apresentaram atividade antileishmania em promastigotas das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) brasiliensis*. Já no estudo de Barros (2018) demonstrou a atividade antileishmania de um novo derivado do dilapiol (EBD) contra à *L. (L.) amazonensis*.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) humano e a atividade antileishmania do éter *n*-butil dilapiol, obtido a partir do dilapiol extraído de *P. aduncum* L. com perspectivas de desenvolver uma formulação para ser aplicada em uma farmacoterapia para leishmaniose tegumentar *in vivo*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Informações Éticas

O presente estudo teve colaborador o projeto de doutorado, cujo título “Estudo Experimental *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes portadores de Leishmaniose cutânea antes e após tratamentos alternativos” do Laboratório de Leishmaniose e doença de Chagas, foi submetido e aprovado pelo comitê de ética humano (CEP/UFAM) CAAE: Nº 29406319.2.0000.5020.

Obtenção do derivado (EBD)

A obtenção da semissíntese do EBD foi realizada com a colaboração da Dra. Ana Cristina da Silva Pinto. O EBD foi obtido utilizando duas reações, sendo que, a primeira, em um balão volumétrico foi adicionado o dilapiol, juntamente com THF, Hg (ACO)₂ e *n*-butanol em banho de gelo por 72 h, sendo monitorado por CCD até o reconhecimento da estrutura da molécula. Após a confirmação se iniciou a segunda reação, que através de filtração com os reagentes NaBH₄ e KOH, obteve o derivado EBD, seguiu conforme protocolo de Barros (2018).

Citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Para o ensaio com CMSP foi coletado 10 mL sangue periférico de voluntários sadios, utilizando tubo contendo EDTA, logo foi diluído em um tubo cônico (50 mL) com PBS 1X (1:1) onde foi homogeneizado e, seguiu o protocolo adaptado de Junior (2013). Após 24 horas, as células foram tratadas com o EBD em triplicata nas concentrações de 7,8 a 500 µM por 48 horas. No bioensaio usou-se como controles positivos (Pentacarinat[®] e Glucantime[®]) e como controle negativo (DMSO a 0,2%). A citotoxicidade seguiu o protocolo com alterações de Nakayama et al. (1997).

Obtenção e manutenção de promastigotas de *Leishmania*

Foi utilizada a espécie de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM 5584) e mantidas criopreservadas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, INPA. Foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi), em estufa à 25 °C.

Determinação da atividade antileishmania da concentração inibitória 50% (CI50) do EBD nas formas promastigotas

A atividade antileishmania do EBD foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* nos períodos de 24, 48 e 72 h a 25 °C. Os parasitos foram centrifugados a 4.400 rpm/15 minutos, diluídos e ajustados em câmara de Neubauer para a concentração de 10^6 parasitos mL⁻¹. Os controles positivos do teste foram (Pentacarinat[®] e Glucantime[®]) e como controle negativo (DMSO a 0,2%), seguiu com modificações a partir do protocolo de Nakayama et al. (1997).

Determinação da taxa de infecção em CMSP infectadas com *L. (L.) amazonensis*

Após a coleta do sangue de voluntários sadios, as CMSP foram isoladas e mantidas sobre lamínulas de vidro estéril posicionadas dentro das placas de 24 poços, incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 h. Posteriormente, as células foram infectadas as formas promastigotas, e após 2 horas foram lavadas. Em seguida, ocorreu os tratamentos com o EBD, Pentacarinat[®], Glucantime[®] e o Dilapiol, na concentração de 36 µM, por 24 e 48 h em replicata, seguiu o protocolo de Macedo (2015). Ao final do bioensaio, as lamínulas foram retiradas e coradas por kit panóptico, e analisadas em microscópio ótico (1000x).

Determinação do índice de seletividade em CMSP

Com o objetivo de determinar a seletividade das concentrações com atividade antileishmania, usou-se o índice de seletividade (IS) delas, expresso pela seguinte fórmula = CC50 em células (citotoxicidade)/CI50 contra *Leishmania*.

Análise Estatística

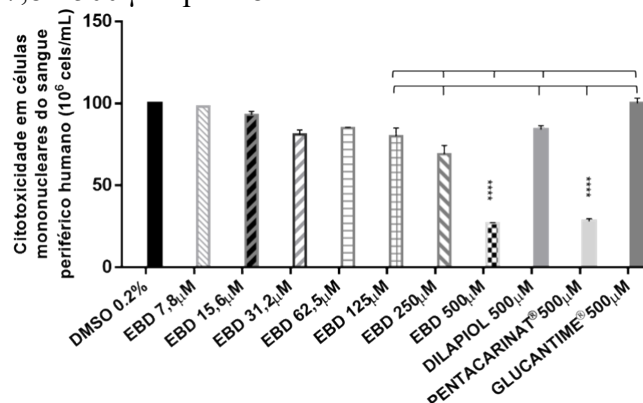
Os dados obtidos das análises *in vitro* foram inseridos em um banco de dados previamente elaborado no programa GraphPad Prism 6.0, e em seguida, analisados estatisticamente através dos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Tukey, utilizou limite de 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da atividade citotóxica do Éter *n*-butil dilapiol (EBD) em CMSP

A partir dos testes de citotoxicidade em CMSP, o EBD mostrou uma CC50 de $350 \pm 0,4$ µM, enquanto, que a Pentacarinat[®] de $188,2 \pm 1,8$ µM, demonstrando que o EBD apresentou um perfil menos tóxico do que a Pentacarinat[®] por 48 h, corroborando com estudo de Barros (2018) que mostrou em macrófagos peritoneais exposto ao EBD um perfil tóxico seguro. Ambas as substâncias apresentaram um P<0,0001 de toxicidade maior do que as demais substâncias testadas no estudo, conforme a figura abaixo.

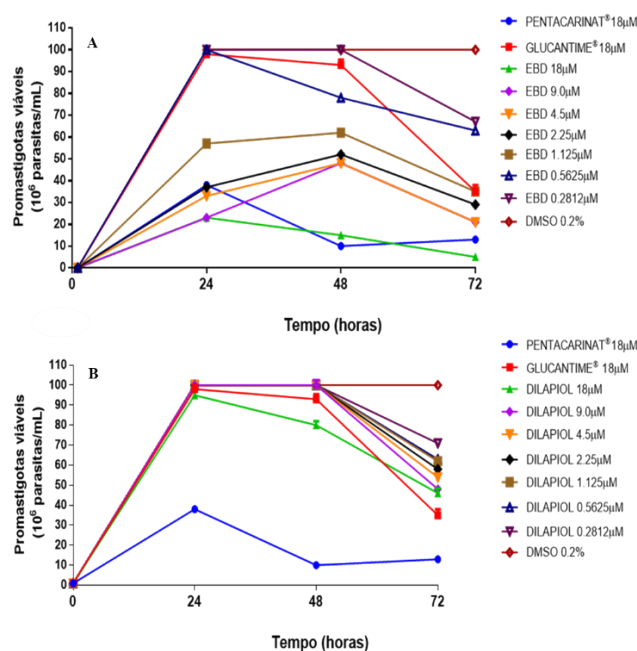
Figura 1. Efeito das substâncias: Pentacarinat[®], Glucantime[®], EBD e o Dilapiol, utilizados nas concentrações de 7,8 a 500 µM por 48 horas.



Avaliação da atividade inibitória do EBD contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Os resultados obtidos do EBD contra *L. (L.) amazonensis*, nas diferentes concentrações (0,2812 a 18 µM) demonstrou uma redução na concentração dos parasitas viáveis às formas promastigotas, apresentou uma concentração inibitória de 50% (CI50) de 3,0; 3,2 e 3,0 µM, a Pentacarinat[®] de 3,4; 3,0 e 2,9 µM por 24, 48 e 72 h respectivamente, quando comparados com o DMSO a 0.2%, conforme figura 2. Resultados similares vistos no estudo de Farah et al. (2010) demonstraram atividade antileishmania através do derivado isodilapiol, utilizando uma concentração de 50 µg/mL em promastigotas de *L. chagasi*, por 72 h, inibindo 96% dos parasitas viáveis. No estudo de Barros (2018) demonstrou atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* com uma CI50 de 1,6 µM do éter *n*-butil dilapiol por 72 h.

Figura 2. Avaliação da atividade do EBD (A) contra as formas de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* – quantificação das formas viáveis dos parasitos por 24, 48 e 72 h, além da Pentacarinat[®], Glucantime[®] e Dilapiol (B). Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança através do programa GraphPad prism 6[®].



Determinação do Índice de Seletividade (IS)

Os resultados estão dispostos na Tabela 1. Observou-se que o IS do EBD foi de 109,4 μ M, e da Pentacarinat[®] de 62,7 μ M, determinando que o EBD nesse tempo apresentou menos tóxico do que a Pentacarinat[®]. Em relação ao Dilapiol e Glucantime[®] não foi possível obter o IS, devido a não obtenção da CI50 as formas promastigotas e a CC50 em macrófagos. No estudo de Barros (2018) mostrou um IS 76.5, demonstrando que a substância EBD teve mais afinidade tóxica para a *L. amazonensis* do que para os macrófagos peritoneais por 48 h. Com isso, justifica nossos achados. Já que para um protótipo ser considerado promissor a virar um fármaco, tem que apresentar um IS igual ou maior que 10 (Chiaradia *et al.*, 2007).

Tabela 1. Valores de CI50 em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e CC50 em

	CI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IS
	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. amazonensis</i>
	IM 5584	CMSP	IM 5584
	48h	48h	48h
Dilapiol	ND	ND	ND
EBD	3.2 ± 1	350.0 ± 0.4	109.4
Glucantime [®]	ND	ND	ND
Pentacarinat [®]	3.0 ± 3	188,2 ± 1.8	62.7

CMSP e seus respectivos Índices de Seletividade (IS) por 48 horas.

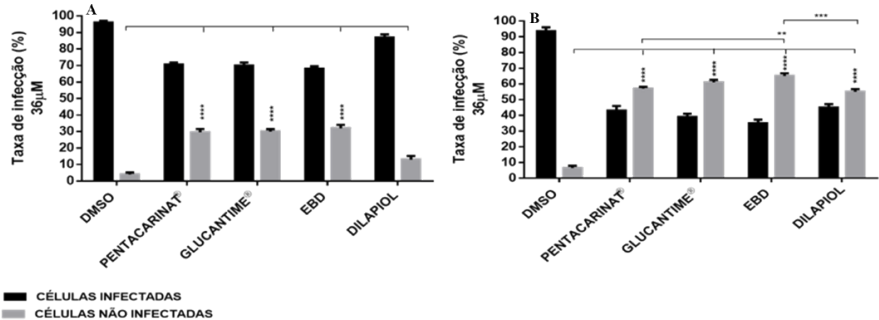
CI50 = Concentração inibitória 50%

CC50 = Concentração citotóxica para 50% ND = Não determinado

Determinação da taxa de infecção em CMSP infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*

A figura 3 mostra a eficácia das substâncias (EBD, Pentacarinat[®], Glucantime[®] e dilapiol) na concentração de 36 μ M, quando em contato com as CMSP infectadas com *L. amazonensis* em relação ao tempo. Em 24 h (gráfico A), o EBD mostrou uma atividade similar aos medicamentos padrão, apresentou um P<0,0001, quando comparado com DMSO 0,2%. Já em 48 h (gráfico B), o EBD inibiu as formas intracelular em 65,5% em relação a Pentacarinat[®] e teve um resultado similar ao Glucantime[®] (61%). Estudo de Barros (2018) mostrou que o éter *n*-butil dilapiol inibiu as formas amastigotas em torno de 88% numa concentração de 4.5 μ M, em macrófagos peritoneais por 48 h. Resultados semelhantes ao do nosso estudo, indicando que o EBD é promissor para atividade antileishmania.

Figura 3. Avaliação da taxa de infecção do EBD, Dilapiol, Pentacarinat[®], Glucantime[®] (36 μ M) contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por 24 e 48 h. Os resultados foram obtidos através da análise por ANOVA (two-way) e Bonferroni's com 95% de confiança, através do programa GraphPad prisma6[®]. As percentagens foram calculadas pelas percentagens das médias comparado a % CN (percentagem do controle negativo).



4 CONCLUSÃO

Por meio dos testes realizados *in vitro* com o éter *n*-butil dilapiol, observou-se que o análogo mostra um perfil não tóxico em CMSP. Além de mostrar atividade antileishmania similar aos medicamentos padrão, para as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, mostrando ser uma molécula promissora, mas requer mais estudos, no *in vivo* para saber o seu comportamento em uma formulação para tratar a Leishmaniose tegumentar.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VE´LEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e35671, 2012.

BARROS, A. M. C. 2018. **Atividade antileishmania de um derivado do dilapiol obtido a partir de *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 106p. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2017. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2ad ed. Brasil. 191p.

CHIARADIA, L. D.; DOS SANTOS, R.; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and Pharmacological Activity of Chalcones Derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS: Quantitative Structure-activity Relationships. **Bio. Med. Chem.**: v. 16, p. 658-667, 2007.

FARAH, D; PARISE-FILHO, R.; MAGRI, F.; BONARDO, V.;1, P FIORINO, P.; V FARAH, V.; M FONTELES, M.; DELORENZI, J. Anti-promastigote activity of dillapiole and isodillapiole against *Leishmania chagasi*. **Planta Med.**, v. 76, p. 480. 2010.

JUNIOR, I. A. S. 2013. **Avaliação da metaciclogênese *in vitro* de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis***. Originalmente apresentado como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2013.

LOPES, C. M. C.; LAZZARINI, J. R.; SOARES JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C. Phytotherapy: yesterday, today, and Forever. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 765-768, 2018. MACEDO, M. N. 2015. **Avaliação do papel de monócitos/macrófagos na leishmaniose disseminada causada por *L. braziliensis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 168 pp.2015.

MENEZES, G. N de. 2018. Desenvolvimento e avaliação de sistemas emulsionados contendo óleo essencial de *Piper aduncum* em relação à penetração cutânea de dilapiol. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Brasília, Brasília. 90p. 2018.

NAKAYAMA, G, R.; CATON, M.C.; NOVA, M. P.; PARANDOSSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

OMS 2013. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2013. World Health Organization. OMS 2017. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee

on the Control of Leishmaniase. Organización Panamericana de La Salud. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.: OPS, 2017.

PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K. F. M.; MAGRI, F. M. M; FERREIRA, A. K.; SILVA, B. A. V. G DA.; DAMIÃO, M. C. F. C. B. et al. Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiole analogues. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, p. 934- 944, 2012.

TOMAR, S. S.; MAHESHWARI M. L.; MUKERJEE, S. K. syntheses and synergistic activity of some pyrethrum synergists from dillapiole. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, p.1479-1483, 1979. VASQUEZ-OCMÍN, P.G.; GADEA, A.; COJEAN, S., MARTI, G.; POMEL, S.; VAN BAELEN, A. C.; RUIZ-VASQUEZ, L.; MESI, A. W. R.; DE FIGADÈRE, B.; MESIA, L. R.; MACIUK, A. Metabolomic approach of the antiprotozoal activity of medicinal Piper species used in Peruvian Amazon. **J Ethnopharmacol**, v. 264, p. 2021.