

1.06.01- Química / Química Orgânica.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Thuja occidentalis* E *Leptospermum scoparium* SOBRE *Leishmania infantum*.

Letícia Kelly M. Rodrigues¹, Marina S. Nunes², Sara Talita V. Florêncio², Valdir Ferreira de P. Junior³, Jean Parcelli C. do Vale⁴, Paulo N. Bandeira⁴, Hélcio S. dos Santos⁴, Mário G. de Carvalho⁵, Fernanda Cristina M. Rondon⁶, Claudia Maria L. Bevilaqua⁶, Geovany A. Gomes⁷

1. Estudante de IC do Curso de Química da UVA

2. Estudante de IC da Faculdade de Veterinária da UECE

3. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE

4. Pesquisador do Curso de Química da UVA

5. Pesquisador do Curso de Química da UFRRJ

6. Faculdade de Veterinária da UECE / Orientadora

7. Curso de Química da UVA / Orientador

Resumo:

Novos princípios ativos para o tratamento da Leishmaniose Visceral são necessários. O objetivo deste trabalho foi determinar a composição dos óleos essenciais de *Thuja occidentalis* (OTO) e *Leptospermum scoparium* (OLS), bem como avaliar a ação dos mesmos frente à *Leishmania infantum*.

As análises dos óleos em CG/EM e CG/DIC permitiu identificar α -tuiona como componente mais abundante de OTO, e *cis*-calameneno e leptospermona como os majoritários de OLS.

O bioensaio foi realizado e após 24 horas de incubação de promastigotas de *L. infantum* com os óleos, foi feito o MTT. Após leitura em leitor de microplacas, foram obtidas densidades ópticas que foram analisadas em software GraphPrism 6.0. OTO demonstrou efeito contra as promastigotas sendo similar ao do controle positivo Anfotericina B. Já OLS foi ineficaz sobre as promastigotas.

Ambos os óleos deverão ser testados sobre amastigotas de *L. infantum* e macrófagos de mamíferos a fim de serem considerados aptos para os testes *in vivo*.

Palavras-chave:

Produto Natural; *in vitro*; Leishmaniose Visceral.

Introdução:

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose cujo agente etiológico é o protozoário *Leishmania infantum*¹. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório envolvido na manutenção do ciclo zoonótico predominante em regiões do Brasil. A imunossupressão causada por *Leishmania spp.* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LV Canina (LVC)².

A quimioterapia usada no tratamento da leishmaniose é baseada na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos. Além disso, esse tratamento não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, pois a resistência e a sensibilidade de diferentes cepas às drogas existentes também dificultam o tratamento³. Em cães, o tratamento não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito e não proporciona a cura⁴.

A ausência de uma vacina eficaz contra leishmaniose leva a necessidade urgente de drogas efetivas para substituir ou suplementar aquelas de uso corrente.

Nesse contexto, estudos têm direcionado esforços em prol de investigações sobre extratos, óleos essenciais e metabólitos especiais puros obtidos de plantas que são eficazes contra *Leishmania spp* e têm reduzida toxicidade para hospedeiros humanos⁵.

Óleos essenciais são misturas complexas constituídas por substâncias de baixo peso molecular, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, entre outras, pertencentes ao metabolismo secundário das plantas⁶.

Thuja occidentalis L. (Cupressaceae), comumente conhecido como Arbor vitae ou cedro branco, é empregado na medicina popular para tratar catarro brônquico, enurese, cistite, psoríase, carcinomas uterinos, amenorréia e reumatismo⁷. Estudos realizados com seu óleo essencial relatam sua ação antimicrobiana⁸, nematicida e inseticida⁹.

Leptospermum scoparium JR & G Forst (Myrtaceae), conhecida com árvore Manuka, tem seus diferentes extratos empregados na medicina tradicional como sedativos e remédios para cicatrização de feridas¹⁰. Atividades antiinflamatória, antimicrobiana,

herbicida e acaricida de seu óleo essencial estão descritas na literatura¹¹.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química dos óleos essenciais de *T. occidentalis* (OTO) e *L. scoparium* (OLS), bem como avaliar a ação anti-*Leishmania* dos mesmos sobre promastigotas de *Leishmania infantum*.

Metodologia:

Os óleos essenciais foram adquiridos comercialmente na loja virtual de uma empresa do ramo de Aromaterapia. OTO e OLS são originários, respectivamente, do Brasil e da Austrália, sendo os mesmos obtidos a partir de suas folhas pelo método de destilação de arraste a vapor.

As análises dos óleos para determinação da composição foram realizadas no Departamento de Química da UFRRJ (Seropédica-RJ).

Dessa forma, os óleos tiveram sua análise qualitativa efetuada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM). Os constituintes dos óleos foram identificados através da comparação visual de seus espectros de massas com aqueles existentes na literatura¹² e espectros fornecidos pelo banco de dados (NIST08) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles existentes na literatura¹². Uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20) foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra, e utilizada para obter os índices de retenção conforme descrito por Van Den Dool e Kratz¹³.

Para quantificação dos constituintes, os óleos foram analisados em cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chamas (CG/DIC). A percentagem dos constituintes foi calculada através da área de integral de seus respectivos picos, relacionadas com a área total de todos os constituintes da amostra.

O bioensaio de atividade anti-*Leishmania* foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias – LABODOPAR da UECE (Fortaleza-Ce).

Assim, promastigotas da cepa *Leishmania infantum* MHOM/BR/1972/LD foram cultivadas em meio M199, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), HEPES, Hemina bovina (Inlab®), bicarbonato de sódio e 40mg/mL gentamicina com pH 7,2 – 7,4. O cultivo foi mantido em estufa tipo BOD (23,6 °C) e o repique foi feito a cada 3 dias. As promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração final utilizada foi de $1,25 \times 10^6$ promastigotas/poço.

As concentrações dos óleos usadas no

experimento variaram de 0,098 a 100 µg/mL e foram obtidas a partir da diluição em série, de acordo com Rondon et al.¹⁴. Após 24h de incubação dos parasitos com os óleos, foi realizado o teste com o MTT para determinar a concentração inibitória de 50% das células (CI₅₀). Para o controle positivo foi empregada a anfotericina B e para o controle negativo foi usado apenas o meio com os parasitos. Os óleos foram testados em triplicata. Os resultados foram lidos com leitora de microplaca Multiskan MS com filtro de 570nm.

Após a transformação dos dados, as densidades ópticas (DO) foram normalizadas para valores percentuais onde o maior valor de DO foi considerado 100% de viabilidade (parasitos vivos) e o menor valor de DO considerado de 0% (parasitos mortos). Depois, foi instituída a análise por regressão não-linear para determinação da CI₅₀. Para análise comparativa entre os tratamentos e o controle positivo foi aplicado a ANOVA two-way seguido do teste de Bonferroni. Todas as análises foram elaboradas no software GraphPad Prism 6.0.

Resultados e Discussão:

Os componentes de OTO e OLS foram identificados e estão listados na Tabela 1.

Quanto ao OTO, onze constituintes químicos, representando 100% desse óleo, foram identificados. Entre esses, foram identificados oito hidrocarbonetos monoterpênicos (22,98%) e três monoterpênicos oxigenados (77,02%), sendo a última a classe de substâncias a mais abundante no óleo. A análise desse óleo revelou, ainda, que α -tuiona é o constituinte majoritário com teor de 66,53%.

Em relação ao OLS, um total de 20 constituintes, representando 99,99% do óleo, foram detectados. Entre esses, foram reconhecidos um hidrocarboneto monoterpênico (1,22%), 13 hidrocarbonetos sesquiterpênicos (59,89%), três tricetonas (35,72%) e três sesquiterpênicos oxigenados (3,16%). Assim, esses dados revelam que os hidrocarbonetos sesquiterpênicos são a classe de compostos mais abundantes no OLS.

Além disso, a análise revelou, como componentes majoritários desse óleo, o *cis*-calameneno (26,63%) e a leptospermona (23,03%).

Tabela 1. Composição, percentagens dos componentes identificados e das classes (%) nos óleos essenciais de *Thuja occidentalis* (OTO) e *Leptospermum scoparium* (OLS)

Componentes identificados	OTO%	OLS%
<i>Hidrocarbonetos monoterpênicos</i>	22,98	1,22
α-thujeno	0,81	-
α-pineno	1,77	1,22
Sabineno	13,41	-
Mirceno	1,79	-
α-terpineno	0,96	-
para-cimeno	1,21	-
Limoneno	1,17	-
γ-terpineno	1,86	-
<i>Monoterpenos oxigenados</i>	77,02	-
α-tuiona	66,53	-
β-tuiona	4,74	-
Terpinen-4-ol	5,74	-
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>	-	59,89
α-cubebeno	-	2,40
α-ylangeno	-	6,21
α-gurjuneno	-	1,00
E-cariofileno	-	1,96
Aromadendreno	-	2,76
trans-murrola-3,5-dieno	-	1,34
allo-aromadendreno	-	0,82
dauca-5,8-dieno	-	1,90
trans-cadina-1(6),4-dieno	-	0,51
β-selineno	-	6,34
α-selineno	-	4,81
cis-calameneno	-	26,63
trans-cadina-1,4-dieno	-	3,21
<i>Tricetonas</i>	-	35,72
Flavesona	-	5,62
iso-leptospermona	-	7,07
Leptospermona	-	23,03
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>	-	3,16
Espatuleno	-	0,85
óxido de cariofileno	-	1,40
Cubenol	-	0,91
Total	100	99,99

Em relação ao bioensaio com promastigotas de *Leishmania infantum*, o OTO apresentou efeito sobre promastigotas com valor de CI_{50} de 0,050 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{95} de 0,031 - 0,082) sendo similar ao controle positivo Anfotericina B, cujo valor de CI_{50} foi de 0,051 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{95} de 0,026 - 0,099). Já o OLS não apresentou efeito sobre promastigotas. De acordo com a literatura, produtos que apresentam valores de CI_{50} inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$ são considerados com atividade elevada contra organismos eucarióticos, como *Leishmania ssp.* Portanto, somente o OTO exibiu promissora atividade leishmanicida quando testado frente às formas promastigotas

de *L. infantum*.

O potencial leishmanicida de óleos essenciais tem sido descrito na literatura. Por exemplo, o estudo realizado por Rosa et al.¹⁶ relata que o óleo de *Croton cajucara*, rico em linalol, apresentou CI_{50} de 0,008 $\mu\text{g/mL}$ frente a promastigotas da espécie *L. amazonensis*. Em outro trabalho, foi descrito CI_{50} de 19,76 $\mu\text{g/mL}$ resultante do efeito biocida do óleo de *Lippia sidoides*, abundante em timol, contra promastigotas de *L. chagasi* (sinonímia *Leishmania infantum*)¹⁴.

Geralmente, o constituinte majoritário é o responsável pela atividade biológica apresentada pelo óleo essencial¹⁷.

Assim, no presente trabalho, a propriedade anti-*Leishmania* exibida pelo OTO pode estar associada ao alto teor do monoterpeno α-tuiona em sua composição.

Conclusões:

A análise química dos óleos possibilitou identificar α-tuiona como componente mais abundante do OTO e cis-calameneno e leptospermona como os majoritários de OLS.

Os resultados do bioensaio mostraram que OTO apresentou elevada atividade contra promastigotas *L. infantum*. Essa atividade biológica pode estar associada ao elevado teor de α-tuiona nesse óleo.

Apesar do OLS não ter apresentado efeito sobre promastigotas, isso não é o suficiente para o mesmo ser totalmente menosprezado visto que a forma presente no hospedeiro mamífero é a amastigota, parasito intracelular obrigatório de células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Assim, ainda é necessária a análise *in vitro* desses dois óleos contra as amastigotas de *L. infantum* e a citotoxicidade em macrófagos de mamíferos para então serem considerados aptos para os testes *in vivo*.

Referências bibliográficas

- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revta Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 352-356, 2006.
- GALLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitas: lasleishmaniosis. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**, v. 23, p. 661-676, 2004.
- OSÓRIO, E et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 630-635, 2007.
- SESSA, P. A.; FALQUETO, A., VAREJÃO,

- J. B. M. Tentativa de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana por meio do tratamento dos cães doentes. **Cad. de Saúde Pública**, v. 10, p. 457-463, 1994.
5. MENEGUETTI, D. U. O. et al. Plantas da Amazônia brasileira com potencial leishmanicida *in vitro*. **Rev Patol Trop**, v. 44, p. 359-374, 2015
6. JACOB, R. G. et al. Óleos essenciais como matéria-prima sustentável para o preparo de produtos com maior valor agregado. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, p. 294-316, 2017.
7. NASER, B. et al. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2, p. 69–78, 2005.
8. TSIRI, D. et al. Chemosystematic value of essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland—Antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, p. 4707–4715, 2009.
9. DHIMAN, A.; et al. An appraisal on pharmacognosy, phytochemistry and bioactivity of *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae). **J. Pharm. Sci. Innov.**, v. 1, p. 1-5, 2012.
10. KATO, Y. et al. Identification of a novel glycoside, leptosin, as a chemical marker of manuka honey. **J. Agric. Food Chem**, v. 60, p. 3418–3423, 2012.
11. JEONG, E. Y.; KIM, M. G.; LEE, H. S. Acaricidal activity of triketone analogues derived from *Leptospermum scoparium* oil against house-dust and stored-food mites. **Pest Manag. Sci.**, v. 65, p. 327-331 2009.
12. ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
13. VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 11, p. 463-471, 1963.
14. RONDON, F. C. M.; et al. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 16, p. 185-191, 2012.
15. MENEGUETTI, D. U. O. et al. Plantas da Amazônia Brasileira com Potencial leishmanicida *in vitro*. **Ver. Patol.Trop.**, v. 44, p. 359-374, 2015.
16. ROSA, M. S. S.; et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 1895-1901, 2003.
17. OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 4, p. 162-175, 2013.