

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*

Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*

In vitro* cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis

MSc. Nadghia F. Leite, MSc. Celestina E. Sobral-Souza, BSc. Rosimeire S. Albuquerque, MSc. Dara I. V. Brito, MSc. Anne K. L. S. Lavor, BSc. Liscássia B. B. Alencar, BSc. Saulo R. Tintino, BSc. João V. A. Ferreira, MSc. Fernando G. Figueredo, MSc. Luciene F. Lima, PhD. Francisco A. B. Cunha, PhD. Antônio I. Pinho, PhD. Henrique D. M. Coutinho

Universidade Regional do Cariri. Crato-CE, Brasil.

RESUMO

Introdução: as doenças negligenciadas persistem por conta de falhas da ciência e acometem principalmente países em desenvolvimento, como exemplos podemos citar a doença de Chagas e a leishmaniose.

Objetivo: avaliar o potencial antiparasitário *in vitro* de um terpenóide componente de óleo essencial, o cariofileno e o eugenol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. brasiliensis*, respectivamente, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

Métodos: para os estudos *in vitro* de *T. cruzi*, foi usado o clone B5-CL, estavelmente transfectadas com o gene de *Escherichia coli* β-galactosidase (lacZ). Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizadas utilizando a estirpe de *L. brasiliensis*, cultivadas a 22 °C em meio de Schneider de *Drosophila* suplementado com FBS a 20 %. Para os testes de atividade antiepimastigota, antipromastigota foram utilizados placas de 96 poços com culturas que não tinham atingido a fase estacionária. Os ensaios de citotoxicidade utilizado estirpe de fibroblastos NCTC929 cultivadas em Meio Essencial Mínimo (Sigma). A viabilidade dessas linhagens através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

Resultados: as substâncias cariofileno e eugenol foram testadas quanto à atividade antiepipimastigota, antipromastigota e quanto à citotoxicidade. Foi visto um efeito clinicamente relevante do cariofileno contra os parasitas *T. cruzi* e *L. brasiliensi*.

Conclusões: os resultados mostram que o cariofileno obteve um melhor resultado quando comparado ao eugenol, sendo capaz de inibir o crescimento dos parasitas testados mostrando uma alternativa contra *T. cruzi* e *L. brasiliensi*. Em relação à citotoxicidade novos testes deverão ser realizados para futuros testes *in vivo*.

Palavras chaves: atividade antiepipimastigota, atividade antipromastigota, cariofileno, eugenol.

RESUMEN

Introducción: las enfermedades desatendidas persisten debido a los fracasos de la ciencia y afectan principalmente a los países en desarrollo, como ejemplos se pueden citar la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

Objetivo: evaluar el potencial de un componente *in vitro* terpenoide antiparasitario aceite esencial, el cariofileno y eugenol contra epimastigotes y promastigotes de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*, respectivamente, así como comprobar su citotoxicidad en células de mamífero.

Métodos: para los estudios *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*, se utilizó el clon B5-CL, transfectadas establemente con el gen de la β galactosidasa de *Escherichia coli*-(lacZ). Los ensayos de inhibición se realizaron con la cepa promastigotes de *Leishmania brasiliensis*, se cultivó a 22 °C en medio de Schneider de *Drosophila* suplementado con FBS 20 %. Para la actividad de las pruebas antiepipimastigota y antipromastigota, se utilizaron placas de 96 pocillos con cultivos que no habían alcanzado la fase estacionaria. En los ensayos de citotoxicidad se utilizó NCTC929, cepa de fibroblastos cultivados en medio esencial mínimo (Sigma). La viabilidad de estas cepas se evaluó mediante el uso de la resazurina como un método colorimétrico.

Resultados: las sustancias cariofileno y eugenol se ensayaron para determinar la actividad antiepipimastigota y antipromastigota, respecto a citotoxicidad. Se observó un efecto clinicamente relevante de cariofileno contra los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*.

Conclusiones: los resultados muestran que con el cariofileno se ha obtenido un mejor resultado en comparación con eugenol, siendo capaz de inhibir el crecimiento de parásitos que presentan una alternativa probada contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*. En cuanto a las pruebas de citotoxicidad, nuevos estudios deben llevarse a cabo para realizar más pruebas *in vivo*.

Palabras clave: actividad antiepipimastigota, actividad antipromastigota, cariofileno, eugenol.

ABSTRACT

Introduction: neglected diseases continue to exist due to failures in science. They mainly affect developing countries. Two examples of neglected diseases are Chagas' disease and leishmaniasis.

Objective: evaluate the potential of an *in vitro* antiparasitic terpenoid essential oil component, caryophyllene and eugenol, against epimastigotes and promastigotes of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*, respectively, and verify their cytotoxicity in mammal cells.

Methods: for *in vitro* studies of *Trypanosoma cruzi*, the B5-CL clone was used, stably transfected with the beta-galactosidase gene of *Escherichia coli*-(lacZ). Inhibition assays were performed on the promastigote strain of *Leishmania braziliensis*, cultured at 22°C in a Schneider's medium of *Drosophila* supplemented with 20% FBS. For anti-epimastigote and anti-promastigote activity tests, 96-well plates were used with cultures which had not reached their stationary stage. NCTC929 was used in cytotoxicity tests, a strain of fibroblasts cultured in minimum essential medium (Sigma). The viability of these strains was evaluated using resazurine as colorimetric method.

Results: the substances caryophyllene and eugenol were assayed to determine their anti-epimastigote and anti-promastigote activity with respect to cytotoxicity. it was found that caryophyllene has a clinically relevant effect against the parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*.

Conclusions: results show that caryophyllene was more effective than eugenol, inhibiting the growth of parasites and thus constituting a proven alternative against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*. As to cytotoxicity testing, new studies should be conducted in which more *in vivo* tests are performed.

Key words: anti-epimastigote activity, anti-promastigote activity, caryophyllene, eugenol.

INTRODUÇÃO

Doenças negligenciadas são aquelas que acometem prevalentemente, países em desenvolvimento. Persistem por conta de falhas da ciência (conhecimentos insuficientes), de mercado (medicamentos ou vacinas existem, mas a um custo proibitivo) e de saúde pública (medicamentos baratos ou mesmo gratuitos que não são utilizados devido a planejamento deficiente).¹ Como exemplos de doenças negligenciadas, podemos citar a doença de Chagas e a leishmaniose.²

A leishmaniose é uma doença que ameaça homens, mulheres e crianças em vários países ao redor do mundo e que afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas. A doença pode ter uma grande variedade de sintomas clínicos e se apresentar na forma cutânea, mucocutânea ou visceral. A Leishmaniose cutânea é a forma mais comum e a forma visceral é mais grave, em que os órgãos vitais do corpo são afetados.³ É causada por parasitas heteroxênicos do gênero *Leishmania* que se apresentam sob duas formas morfológicas durante o seu ciclo de vida: promastigota e amastigota.⁴

A tripanossomíase americana é conhecida como doença de Chagas, sendo causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e transmitida aos seres humanos principalmente pelas fezes de *Triatomíneos*. É endêmica em 21 países nas Américas, essa zoonose que afeta todo o mundo por que a migração de pessoas infectadas pode levá-lo para países não endêmicos da América e do Mundo. Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas com o *Trypanosoma cruzi* (parasita que causa a doença de Chagas), principalmente na América Latina.⁵ *T. cruzi* possui um complexo ciclo biológico, envolvendo um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado e apresentando três formas distintas: (1) epimastigota, forma presente no vetor e em cultura axênica; (2) tripomastigota, forma sanguínea circulante e infectante; e (3) amastigota, forma de replicação intracelular.⁶

A história da terapêutica experimental destas doenças tem sido marcada por fracassos e sucessos. No caso da doença de Chagas, duas drogas tem tido merecido destaque, o nifurtimox e o benzonidazol, entretanto estes fármacos ainda tem a ação afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, entre outros.⁷ Já para as leishmanioses cutânea e visceral, apesar de sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como drogas de primeira escolha para tratamento. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas terapêuticas, porém apresentam grandes problemas como efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação.⁸

Atualmente as drogas utilizadas para parasitos como *T. cruzi* e *L. braziliensis* apresenta uma alta toxicidade porque metabólitos produzidos comprometem tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade.⁷

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antiparasitário *in vitro* de um terpenóide componente de óleo essencial, o cariofileno e o eugenol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. brasiliensis*, respectivamente, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

MÉTODOS

Para os estudos *in vitro* de *T. cruzi*, foi usado o clone B5-CL.⁹ Os parasitas foram estavelmente transfectadas com o gene de *Escherichia coli* β-galactosidase (lacZ), foram gentilmente cedidas pelo Dr. F. Buckner através Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). Epimastigotas foram cultivados a 28 °C no fígado infusão triptose caldo (Difco, Detroit, MI) com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, SA, Barcelona, Espanha) e estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha), tal como descrito previously,¹⁰ e colhidas durante a fase de crescimento exponencial.

Cultura de Leishmania foi obtida a partir do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Assunção, Paraguai - IICS. A manutenção da pressão, a forma de cultura e isolamento de forma promastigota seguidos os procedimentos descritos por Roldós *et al.*¹⁰ Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizadas utilizando a estirpe de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivadas a 22 °C em meio de Schneider de *Drosophila* suplementado com FBS a 20 %.

Os ensaios de citotoxicidade utilizado estirpe de fibroblastos NCTC929 cultivadas em Meio Essencial Mínimo (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com FBS inativado pelo calor (10 %), penicilina G (100U/mL) e estreptomicina (100 mg). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5 % de CO₂. A viabilidade dessas linhagens foi avaliada de acordo com Roldós *et al.*,¹⁰ através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

Resazurina sal de sódio foi obtido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), e armazenadas a 4 °C protegidos da luz. Uma solução de resazurina foi preparada em tampão de fosfato a 1 %, pH 7, e esterilizado por filtração antes da utilização. Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosido (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvida em 0,9 % de Triton X-100 (pH 7,4). Também foram utilizados penicilina G (Ern, SA, Barcelona, Espanha), estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha), dimetilsulfóxido, cariofileno e eugenol foram obtidos junto a Sigma-Aldrich (S. Louis, USA).

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços com culturas que não tinham atingido a fase estacionária.¹¹ Resumidamente, epimastigotas foram semeadas a 1×10^5 135 mL^{-1} em 200 μL de meio de caldo de triptose de fígado. As placas foram então incubadas com as drogas (0.1-50 $\mu\text{g/mL}$) a 28 °C durante 72 h, altura em que 50 μL de solução CPRG foi adicionado para dar uma concentração final de 200 μm . As placas foram incubadas a 37 °C durante um adicional de 6 h e, em seguida, foram lidos a 595 nm. Cada experiência foi realizada duas vezes e de forma independente, cada concentração foi testada em triplicata em cada experiência. A eficácia de cada composto foi calculada através do cálculo da percentual antiepimastigota (% AE).

O ensaio foi efetuado utilizando uma modificação de um método anterior. As culturas de promastigotas de *L. brasiliensis* foram cultivadas a uma concentração de 106 células/mL e, em seguida, transferido para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO para as concentrações a serem testadas e foram transferidos para microplacas. Cada teste foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72 h por contagem direta de células após diluições em série e em comparação com um controlo não tratado.

NCTC929 fibroblastos foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma concentração final de 3×10^4 células/poço. As células foram cultivadas a 37 °C numa atmosfera de CO_2 a 5 %. Depois disso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μL , e realizada uma nova cultura de 24 h. Após esta incubação, 20 μL de uma solução 2 mM de resazurina foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 3 h e a redução da resazurina foi medida utilizando absorbância nos comprimentos de onda duplo, de 490 e 595 nm. O valor do controlo (em branco) foi subtraída. Cada concentração foi testada em triplicado.

RESULTADOS

O cariofileno demonstrou maior percentual de inibição ao parasita *L. brasiliensis*, sendo capaz de eliminar 100 % da amostra nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Quanto ao *T. cruzi*, o cariofileno inibiu 67 % da amostra na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. O cariofileno não demonstrou citotoxicidade na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (tabela).

O eugenol na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou um percentual de inibição de 17,34 % e 40 % para as amostras de *T. cruzi* e *L. brasiliensi*, respectivamente. A substância não apresentou citotoxicidade na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

DISCUSSÃO

As substâncias cariofileno e eugenol foram testadas quanto à atividade antiepimastigota, antipromastigota e quanto a citotoxicidade.

Trabalhos anteriores mostram que o cariofileno apresentou as seguintes propriedades: antiedêmico e antiinflamatória, fagorrepelente, antitumoral, bactericida, insetífugo e espasmolítico. Algumas destas atividades foram conferidas ao seu óxido-derivado.¹²

Alguns estudos mostraram que eugenol apresentam atividade nematocida, inseticida, antiviral, bactericida e fungicida. Os efeitos bactericida e fungicida do eugenol talvez

expliquem porque a pulverização de sementes de cravo com fungicidas não melhora a germinação.¹³

A substância cariofileno apresentou uma melhor atividade contra as duas linhagens de parasitas quando comparado com o a substância eugenol. Na avaliação da atividade antiparasitária, cariofileno apresentou 67% e 100% de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* em 100 µg/mL, respectivamente, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 100 µg/mL é considerado clinicamente relevante.¹⁴

Os resultados desse trabalho mostram que o cariofileno obteve um melhor resultado quando comparado ao eugenol, sendo capaz de inibir, numa concentração menor, o crescimento dos parasitas testados mostrando uma alternativa contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis*. Em relação à citotoxicidade novos testes deverão ser realizados para futuros testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

1. Morel CM. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. Cadernos de Saúde Pública. 2006;22(8):1522-3.
2. Ministerio da Saude. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saúde Pública. 2010;44(1):200-2.
3. WHO (World Health Organization). Leishmaniasis [acessada Sep 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis>
4. Michalick MSM. Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, editors. Parasitologia humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 31-5.
5. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. [Acessado nov 2010]. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf
6. Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature. 1966;212:1385-6.
7. Dias LC, Dessoay MA. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quimica Nova. 2009;32(9):2444-57.
8. Pereira IO, Sacramento LVS, Marques MJ. Leishmanioses: «o estado da arte». Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 2011;9(1):220-38.
9. Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JA, Gómez-Barrio A: Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;97:1101-5.
10. Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and

Trypanosoma cruzi: In silico, in vitro and in vivo activity studies. European J Medicinal Chemistry. 2008;43:1797-807.

11. Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. Parasitology Research. 2005;95:296-8.

12. Carneiro FB, Júnior ID, Lopes PQ, Macêdo RO. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. Brazilian J Pharmacognosy. 2010;20(4):600-6.

13. Mazzafera P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. Rev Brasileira Botânica. 2003;26(2):231-8.

14. Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Brazilian J Medical Biological Research. 2007;40:663-70.

Recibido: 27 de marzo de 2013.

Aprobado: 30 de junio de 2013.

Henrique Douglas Melo Coutinho. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com