



Atividade *in vitro* de extratos de *Ocotea* em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*¹

Nilma de Souza Fernandes², Vânia Desoti³, Celso Vataru Nakamura⁴, Valdir Florêncio da Veiga Junior⁵

Submetido 01/06/2015 – Aceito 29/04/2016 – Publicado on-line 01/05/2016

Resumo

Os protozoários parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* são agente etiológicos da doença de Chagas e leishmaniose, respectivamente. Considerando-se que as opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento de infecções causadas por esses parasitos têm severos efeitos colaterais e baixa eficácia, a busca por novos agentes quimioterapêuticos eficazes e menos tóxicos é extremamente importante para o tratamento dessas doenças que afetam milhões de pessoas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. No sentido de buscar substâncias bioativas de plantas com potencial para uma nova droga, foi realizada varredura *in vitro* utilizando extratos etanólicos de 3 espécies do gênero *Ocotea* (*Lauraceae*) contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. O extrato de folhas de *O. ceanothifolia* apresentou melhor resultado, com CE₅₀ de 16,6 µg/mL para tripomastigotas de *T. cruzi* e 34,5 µg/mL para promastigotas de *L. amazonensis*, indicando que *O. ceanothifolia* é uma espécie com promissora fonte de substâncias anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, Produtos naturais, Lauraceae

In vitro activity of *Ocotea* extracts in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Protozoan parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* are etiologic agents of Chagas' disease and leishmaniasis, respectively. These diseases affect millions people in underdeveloped and developing countries. Considering that current therapeutic options available for treatment of these infections have severe side effects and low efficacy, the search for new effective and less toxic chemotherapeutic agents is extremely important. In order to find bioactive substances of plants with potential for new drug, we performed an *in vitro* scan using ethanolic extracts of three species of the genus *Ocotea* against *T. cruzi* and *L. amazonensis*. *O. ceanothifolia* leaves extract showed better results, with EC₅₀ of 16.6 mg / mL for *T. cruzi* trypomastigotes and 34.5 mg / mL for *L. amazonensis* promastigotes. Thus, these results indicate that *O. ceanothifolia* is a promising source of substances with anti-*T. cruzi* and anti-*Leishmania* activities.

Key words: Neglected diseases, Natural products, Lauraceae

¹ Parte da tese de doutorado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do primeiro autor junto à Universidade Federal do Amazonas

² Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - Av. Gal. Rodrigo Octávio, 3.000, Coroado II, Manaus, Amazonas. Email: nilma.fernandes@gmail.com.br

³ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá, Paraná. Email: vaniadesoti@gmail.com

⁴ Professor associado da Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Av. Colombo, 5790-Zona 7, Maringá, Paraná. Email: cvnakamura@uem.br

⁵ Professor Associado da Universidade Federal do Amazonas – Departamento de Química, ICE, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 3.000, Coroado II, Manaus, Amazonas. E-mail: valdirveiga@ufam.edu.br

1. Introdução

Os tripanosomátídeos *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* são agentes etiológicos da leishmaniose e da doença de Chagas, respectivamente. São doenças infecciosas que afetam milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2015a, 2015b). O controle dessas parasitoses é dificultado pelas limitações dos medicamentos usados no tratamento, pelo alto custo financeiro, bem como pela ausência de vacina eficaz (MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007). Atualmente, a quimioterapia para ambas as doenças tem baixa eficácia e severos efeitos colaterais, levando ao abandono do tratamento e resistência das cepas (CARDOSO et al., 2014; MAYA et al., 2010; RASSI, 2012). Este cenário mostra a necessidade de desenvolver terapias que inibam a multiplicação e/ou transmissão de agente etiológicos das doenças negligenciadas sem causar severos efeitos colaterais aos pacientes (COURA; DIAS, 2009; ROY et al., 2012).

Plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de doenças parasitárias. Inúmeras pesquisas demonstram que produtos provenientes de plantas tem potencial terapêutico, inclusive com propriedades anti-tripanosomátídeos (ALVES et al., 2012; IZUMI et al., 2011; SCHMIDT et al., 2012).

O gênero *Ocotea* Aubl. é um dos maiores da família *Lauraceae*, com aproximadamente 320 espécies distribuídas principalmente na região subtropical das Américas. É o gênero mais estudado da família e com grande variedade de atividades biológicas reconhecidas (MARQUES, 2001; YAMAGUCHI, et al., 2013).

As espécies *O. ceatnothifolia*, *O. nigrescens* e *O. leucoxylon* apresentam poucos estudos quanto às características químicas e atividades biológicas. Foi demonstrado que o óleo essencial de *O. nigrescens* tem atividade anti-agregação plaquetária (YAMAGUCHI, et al., 2013). Ainda, foi relatada a atividade antioxidante e anticolinesterásica dos extratos etanólicos das três espécies em trabalho anterior do

nosso grupo (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012). Quanto à *O. leucoxylon* foi isolado o alcaloide aporfínico dicentrinona, um inibidor da enzima topoisomerase (ZHOU et al., 2000).

Visto a ausência de informações sobre as espécies de *Ocotea* e o potencial bioativo já relatado para os extratos do gênero, este trabalho avaliou a atividade dos extratos etanólicos de folhas e galhos de *O. ceatnothifolia*, *O. nigrescens* e *O. leucoxylon* frente à *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal e produção do extrato

Duas espécies do gênero *Ocotea* foram coletadas na Reserva Florestal Ducke (*Ocotea ceatnothifolia* (Nees) Mez, *Ocotea leucoxylon* (Sw.) Laness) e uma no campus da Universidade Federal do Amazonas (*Ocotea nigrescens* Vicent), identificados no projeto Flora da Reserva Ducke, identificados pelo Dr. Alberto Vicentini, do INPA.

As folhas e galhos foram limpos e secos em estufa de ar circulante. Em seguida, foram triturados e 300 g de material triturado foi submetido à extração em etanol utilizando aparelho Soxhlet por 24 horas. Após a extração, o material foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotaevaporador, 50 °C, até a evaporação do solvente.

2.2 Atividade anti-*T. cruzi* e anti-*L. amazonensis*

Os experimentos foram realizados com a cepa Y de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura axênica a 28 °C em meio LIT B (*liver infusion tryptose*), pH 7,4 suplementando com 10% de soro fetal bovino inativado. Formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLCMK₂ (células de rim de macaco - *Macaca mulata*) previamente infectadas em de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 2 mM L-glutamina, 10%

FBS, 50 mg/l gentamicina e bicarbonato de sódio. Foram mantidos em estufa com 5% CO₂, a 37 °C.

Para ensaios com promastigotas de *L. amazonensis* foi utilizada a cepa MHOM/BR/Josefa. Os protozoários foram mantidos em meio Warren a 25 °C [brain-heart infusion com hemina (10 µg/mL) e ácido fólico (10 µg/mL), pH 7,2] suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Gibco Invitrogen, New York, NY, USA).

Para avaliar a atividade dos extratos as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram ressuspensas em meio DMEM suplementando com 10% de soro fetal bovino na concentração de 2×10^7 parasitos/mL. A suspensão foi adicionada em placa de 96 poços. Os extratos foram diluídos em DMSO e DMEM no dobro da concentração desejada: 10, 100, 500 e 1000 µg/mL e adicionados na placa que foi incubada por 24 h a 37 °C. A concentração efetiva para 50% dos parasitos (CE₅₀) foi determinada após contagem em microscópio óptico de 50 campos aleatórios.

Para avaliação da inibição de proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis*, 1×10^6 células/mL de parasitos foram inoculados de em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 24 poços na presença dos extratos diluídos em DMSO a 1%, nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. As placas foram incubadas por 96 horas (epimastigotas) ou 72 horas (promastigotas) a 28 °C. Após a incubação foi realizada contagem em câmara de Neubauer das amostras diluídas em formalina. A concentração que inibe a proliferação de 50% dos protozoários (CI₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica.

A citotoxicidade foi avaliada em células LLCMK₂ utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT. $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, os extratos foram

adicionados em concentrações crescentes: 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL e a placa incubada durante 96 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL), após 4 horas os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 492 nm em um espectrofotômetro de placas (Bio Tek–Power Wave XS). A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica. O índice de seletividade foi calculado comparando a citotoxicidade em células de mamífero com a atividade antiprotozoário: CC₅₀/CE₅₀ ou CC₅₀/CI₅₀.

3. Resultados

Os extratos etanólicos foram avaliados em tripomastigotas, a forma não multiplicativa e infectiva de *T. cruzi*. Dentre os extratos etanólicos das três espécies de *Ocotea*, os de folhas de *O. ceanothifolia* e galhos de *O. guianensis* foram considerados ativos com CE₅₀ abaixo de 50 µg/mL frente à tripomastigotas: *O. ceanothifolia* (16,6 µg/mL) e *O. guianensis* (31 µg/mL). Visto a atividade dos dois extratos frente à tripomastigotas, estes foram testados frente à forma epimastigota, forma multiplicativa encontrada no inseto vetor. A atividade inibitória de crescimento de 50% dos parasitos (CI₅₀) foi avaliada após 96 horas de tratamento. A atividade dos extratos testados foi menor em epimastigotas em comparação aos resultados em tripomastigotas (Tabela 1).

A fim de avaliar o índice de seletividade dos dois extratos mais ativos a citotoxicidade em LLCMK₂ foi comparada com a atividade anti-protozoário. O extrato de *O. ceanothifolia* foi 5,4 vezes mais ativo em tripomastigotas e 1,4 vezes mais ativo em epimastigotas. Já o extrato de *O. guianensis* tem índice de seletividade de 3,5 e 1,7 para tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Os resultados indicam que os extratos tem maior toxicidade para os parasitos quando comparados com células de mamífero.

Os ensaios demonstram mostram que as formas tripomastigotas foram mais

susceptíveis ao tratamento com os extratos. Alguns autores sugerem que a diferença de sensibilidade aos tratamentos é devido a fatores morfológicos, bioquímicos e genéticos dos protozoários (GONÇALVES

et al., 2011; IZUMI *et al.*, 2011; PELIZZARO-ROCHA *et al.*, 2010; SOUZA, W., 2009).

Tabela 1 - Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de folhas e galhos em formas tripomomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados estão em concentração responsável pela inibição do crescimento ou viabilidade dos parasitos em 50%. Os valores de CC_{50} são referentes à atividade em linhagem celular LLCMK₂. NR: não realizado. DP: desvio padrão. IS_{tr}: índice de seletividade tripomastigotas. IS_{ep}: índice de seletividade epimastigotas.

Espécies	Parte da planta	Tripomastigota		Epimastigota	
		CE ₅₀ µg/mL ±DP	CI ₅₀ µg/mL ±DP	IS _{tr}	IS _{ep}
<i>O. ceanothifolia</i>	Folhas	16,6±1,2	62,8±4,8	5,4	1,4
<i>O. ceanothifolia</i>	Galhos	221,4±20,1	NR		
<i>O. guianensis</i>	Folhas	80,5±29,3	NR		
<i>O. guianensis</i>	Galhos	31,0±1,4	63,0±9,8	3,5	1,7
<i>O. nigrescens</i>	Folhas	202,4±3,4	NR		
<i>O. nigrescens</i>	Galhos	216,0±12,7	NR		

Vários trabalhos utilizando extratos e óleo essencial de diferentes famílias de plantas demonstraram atividade anti-protozoário (ALVIANO *et al.*, 2012; BERGER *et al.*, 2001; FOURNET *et al.*, 1993; MENNA-BARRETO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2014; SCHINOR *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2012; TEMPONE *et al.*, 2005). A varredura utilizando diversas famílias da flora brasileira, como *Annonaceae*, *Apiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Moraceae*, *Nyctaginaceae* e *Verbenaceae* demonstrou que o extrato etanólico dos frutos de *Ocotea paranapiacabensis* (*Lauraceae*) *Aegiphila lhotzkiana* (*Lamiaceae*) são ativos frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (ALVES *et al.*, 2012). Duas neolignanas isoladas de *Nectandra lineata* e dois alcaloides isolados de *N. megapotamica* também inibiram o crescimento deste protozoário (SANTOS-FILHO; SARTIS 1980).

Os extratos de *Ocotea* ainda foram avaliados em *L. amazonensis* (Tabela 2). O extrato de folhas de *O. ceanothifolia* foi mais ativo, com CI₅₀ de 34,5 µg/mL.

Tabela 2 - Atividade citotóxica dos extratos etanólicos em promastigota de *L. amazonensis*. Os valores representam a concentração do extrato responsável pela inibição de 50% da proliferação do parasito. DP: desvio padrão.

<i>L. amazonensis</i> promastigotas		
Espécies	Parte da planta	CI ₅₀ µg/mL±DP
<i>O. ceanothifolia</i>	folhas	34,5±9,1
<i>O. ceanothifolia</i>	galhos	61,6±2,3
<i>O. guianensis</i>	folhas	547,5±67
<i>O. guianensis</i>	galhos	80,0±35,3
<i>O. nigrescens</i>	folhas	101,0±19,7
<i>O. nigrescens</i>	galhos	322,5±24,7

Várias substâncias provenientes de espécies de *Lauraceae* possuem atividade anti-leishmania. Extratos de *O. lancifolia* e *A. canelila* tem atividade *in vitro* frente à *Leishmania* e *T. cruzi* (FOURNET; BARRIOS; MUÑOZ, 1994; FOURNET *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Lignanas de *N. megapotamica* e *O. duckei* também apresentaram atividade contra o protozoário (DA SILVA FILHO *et al.*, 2008; MONTE NETO *et al.*, 2007). Sánchez-Suárez e



colaboradores (2011) demonstraram que substâncias, principalmente lignanas, extraídas de *O. macrophylla* e *P. cinereum* possuem atividade frente à *L. panamensis* e *L. braziliensis*, embora os extratos brutos destas espécies não tenham demonstrado atividade contra estes protozoários. Este resultado sugere a presença de substâncias com atividade antagonista nos extratos, o que poderia explicar a diminuição de atividade destes em relação à substâncias isoladas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2011).

Observa-se nos resultados obtidos que o extrato das folhas de *O. ceanothifolia* são mais ativos frente *T. cruzi* e *L. amazonensis*, sendo promissor para a avaliação do mecanismo de ação e identificação das substâncias ativas.

4. Conclusão

Os extratos etanólicos obtidos a partir de espécies do gênero *Ocotea*, principalmente de *O. ceanothifolia*, são promissores para melhor avaliação da atividade anti-tripanosomatídeos. O extrato de *O. ceanothifolia* pode ser utilizado para determinação e isolamento das substâncias ativas e avaliação do mecanismo de ação destas em *T. cruzi* e *L. amazonenses*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALVES, R. T. et al. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of**

Pharmacognosy, v. 22, n. 3, p. 528–533, 2012.

ALVIANO, D. S. et al. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–10, jan. 2012.

BERGER, I. et al. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 327–330, 2001.

CARDOSO, E. A. et al. Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**, 2014.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 31–40, 2009.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. December 2007, p. 1307–1310, 2008.

FOURNET, A. et al. Antiprotozoal activity of dehydrozalanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 111–115, 1993.

FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382–384, 2007.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 19–37, 1994.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 651–661, 2011.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p. 809–23, abr. 2011.



MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 195–206, 2001.

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, p. 323–331, 2010.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of Pterodon pubescens seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 111–7, jun. 2008.

MONTE NETO, R. L. et al. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from Ocotea ducket (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, p. 348–352, 2007.

PELIZZARO-ROCHA, K. J. et al. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on Trypanosoma cruzi. **Phytomedicine**, v. 18, p. 36–39, 2010.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, 2012.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581–596, 2007.

RODRIGUES, I. A. et al. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on Leishmania spp. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 7, 2014.

ROY, P. et al. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. v. 6, n. 6, p. 73–87, 2012.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, J. et al. Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species. **Natural product communications**, v. 6, n. 2, p. 231–234, 2011.

SCHINOR, E. C. et al. Effect of extracts and isolated compounds from Chresta scapigera

on viability of Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 295–300, 2007.

SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128–75, jan. 2012.

SILVA, J. R. A. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071–1076, 2009.

SOUZA, W. DE. Structural organization of Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, 2005.

World Health Organization. **Leishmaniasis - Fact sheet N°375**, 2015a.

World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis) - Fact sheet N°340**, 2015b.

YAMAGUCHI, K. et al. Chemical Composition and Platelet Aggregation Activity of Essential Oils of Two Species of the Genus Ocotea (Lauraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 518–523, 4 jul. 2013.

YAMAGUCHI, K.; ALCÂNTARA, J.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA. Investigação do potencial antioxidante e anticolinester sico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541–546, 2012.

ZHOU, B. N. et al. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from Ocotea leucoxydon. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 2, p. 217–221, 2000.