

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIEPIMASTIGOTA E CITOTOXIDADE DO CITRONELOL

Jarlene Pereira Lima¹, Edclécia da Silva Santos¹, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga², Henrique Douglas Melo Coutinho³

Resumo

A doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde encontrado frequentemente nas Américas e principalmente na América Latina. O processo de desenvolvimento de novos fármacos não tem conseguido acompanhar a rápida evolução dos microrganismos e a ciência tem reunido esforços para buscar novas substâncias que possam desarticular as defesas desenvolvidas em função da exposição a drogas. Os derivados do nifurtimox e benzonidazol são os fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas, com isso há um interesse pela utilização de produtos naturais em favor do bem estar da humanidade dada em tempos remotos. O citronelol é um composto presente nos óleos essenciais das espécies de plantas diferentes aromáticas, é um monoterpene acíclico natural considerado como excelente aromatizante de ambientes, que além de ser um poderoso repelente de insetos, também apresenta atividade antimicrobiana, além de apresentar atividade neuroprotetora. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade do componente de óleo essencial, o citronelol, sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* e a citotoxicidade deste em células de mamífero. A linhagem de células utilizadas no teste de citotoxicidade foi a de fibroblastos de mamíferos NCTC clone 929, e para estudos *in vitro* de *T. cruzi*, foram usados cepas de parasito CL-B5 (clone CL-B5). A medição de viabilidade celular foi feita por ensaio colorimétrico quantitativo utilizando o indicador de oxidação-redução resazurina. O nifurtimox foi utilizado como droga de referência. Os resultados obtidos através dos testes antiparasitários contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, mostraram que o composto citronelol, apresentou uma moderada atividade tripanocida frente às formas epimastigotas, contudo também demonstrou uma elevada citotoxicidade.

Palavras-Chave: Citotoxicidade, Citronelol, *Trypanosoma cruzi*.

ASSESSMENT OF POTENTIAL ANTIEPIMASTIGOTA AND CYTOTOXICITY OF CITRONELOL

Abstract

Chagas disease is a major health problems often found in the Americas, especially in Latin America. The process of drug development has not kept pace with the rapid development of microorganisms and science have gathered efforts to find new substances that can disrupt defenses developed as a function of drug exposure. Derivatives of nifurtimox and benznidazole are the drugs used to treat Chagas disease, thus there is an interest in the use of natural products for the well being of humanity given in ancient times. The citronelol is a compound present in the essential oils of various aromatic plant species, is a natural acyclic monoterpene considered excellent flavoring environments, which besides being a powerful insect repellent, also has antimicrobial activity and presents neuroprotective activity. The aim of this study was to evaluate the activity of the essential oil component, citronellol, on the epimastigote form of this *Trypanosoma cruzi* and cytotoxicity in mammalian

¹ Graduada em Ciências Biológicas, pela URCA.

² Doutoranda em Etnobiologia e conservação da natureza pela URCA e atual professora da URCA

³ Doutor em Farmacologia pela UFPB e atual professor da URCA

cells. The cell line used in the cytotoxicity test was the fibroblasts of mammals NCTC clone 929, and for *in vitro* studies of *T. cruzi* parasite strains were used CL-B5 (clone CL-B5). Measurement of cell viability was done by colorimetric assay using the quantitative oxidation-reduction indicator resazurin. The nifurtimox was used as reference drug. The results obtained through tests antiparasitic against epimastigotes of *T. cruzi*, showed that the compound citronellol, showed a moderate trypanocidal activity against epimastigotes, but also showed a high cytotoxicity.

Keywords: Cytotoxicity, Citronellol, Trypanosomacruzi

Introdução

Doenças parasitárias de elevada incidência em países pobres como a doença de Chagas tem sido um grande desafio, no que diz respeito a sua terapêutica, pois além dessa doença não chamar atenção da indústria farmacêutica, as drogas atualmente existentes para seus tratamentos apresentam elevada toxicidade (WHO,2010). A doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, constitui uma zoonose frequente nas Américas e principalmente na América Latina. Tendo sido descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é considerada um dos principais problemas de saúde encontrado neste continente (NEVES, 2004).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos não tem conseguido acompanhar a rápida evolução dos microrganismos, a ciência tem reunido esforços para buscar novas substâncias que possam desarticular as defesas desenvolvidas em função da exposição a drogas. Por isso os produtos naturais de origem vegetal ou animal, tem sido o ponto crítico de diversas pesquisas envolvidas em atividades biocidas, naturalmente desenvolvidas por seres vivos para garantia de sobrevivência entre as espécies (SIMÕES *et al.*, 2010).

O citronelol é uma essência e também um composto de grande interesse para as indústrias sendo que ele pode ser usado para sintetizar outro composto como o citronelal. O Citronelol trata-se de um monoterpeno que pode interferir nas funções bioquímicas e fisiológicas da planta impedindo a ação de insetos herbívoros. Em função disso, os monoterpenos têm sido comercializados como inseticidas sintéticos já que são reconhecidos pela *United States Food and Drug*, por isso também tem sido utilizado como produtos de uso humano como, por exemplo, os aromatizantes (DUNKEL, SEARES, 1998).

Objetivo

Avaliar a atividade tripanocida do citronelol através de ensaios *in vitro* frente a formas epimastigotas de *Trypanosomacruzie* verificar os níveis de citotoxicidade desse composto em fibroblastos de mamíferos.

Método

A substância avaliada foi o citronelol, fornecida pela empresa Sigma ChemicalCo. (St. Louis E.U.A.). A linhagem de células utilizadas no teste de citotoxicidade foi a de fibroblastos de mamíferos NCTC clone 929, cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute*(RPMI). Para estudos *in vitro* de *T. cruzi*, cepas de parasito CL-B5(clone CL-B5) foram usados (BUCKNER *et al.*, 1996). Os parasitos estavelmente transfectados com o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* (LacZ) foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Buckner através da Universidad Complutense de Madrid (Espanã). Formas epimastigotas foram cultivadas em meios de infusão de fígado triptose (LIT) com 10% de soro fetal bovino (FBS).A Resazurina sódica foi obtida a Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e armazenada a 4⁰C protegida da luz, e utilizada para o teste de viabilidade celular.

O procedimento para a medição de viabilidade celular foi avaliada com resazurina por um método colorimétrico descrito por Rólon, et al., 2006. Células clones NCTC 929 foram semeadas (3×10^4) em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços, com 100 μL de meio de cultura RPMI 1640 por poço. As células foram cultivadas durante a noite a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Posteriormente o meio foi substituído e o produto natural (extrato ou frações) foi adicionado em diferentes concentrações em 200 μL do meio por 24 h. Controles de crescimento também foram incluídos. Após a incubação, 20 μL de solução resazurina a 2mM foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 3 h para permitir condições ótimas de oxidação-redução e a redução da resazurina foi determinada por a medida de absorbância do comprimento de onda a 490 e 595 nm em um leitor de microplacas. Cada concentração foi testada três vezes.

O ensaio de rastreamento para os testes de suscetibilidade para as formas epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços (Sarstedt, Sarstedt, Inc.) com culturas que não atingiram a fase estacionária, como descrito por Vega *et al.*, (2005). Epimastigotas foram semeados a 1×10^5 por mililitro em 200 μL e as placas foram então encubadas com os produtos a 28°C por 72 horas, momento em que 50 μL de solução de CPRG foram adicionados para dar a concentração final de 200 μM . As placas foram incubadas a 37°C por mais 6 h adicionais e então lidas a 595 nm em espectrofotômetro. O nifurtimox foi utilizado como droga de referência. Cada concentração foi testada em triplicata.

Resultados e Discussão

s resultados obtidos através dos testes antiparasitários (Tabela 1) contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*, mostraram que o composto citronelol, presente nos óleos essenciais de diferentes espécies de plantas aromáticas, apresentou uma moderada atividade tripanocida frente às formas epimastigotas, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e uma baixa atividade quando usada na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Contudo o mesmo também demonstrou uma elevada citotoxicidade na concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 1: Atividade antiepipimastigota e citotoxicidade do citronelol.

Produto	Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}$	%AE	+/-%DS	%C	+/-%DS
citronelol	100	52,94	5,39	84,07	0,66
	50	44,71	4,08	55,31	5,59

Conc: Concentração utilizada nos testes; %AE: percentual da atividade antiepipimastigota; +/-%DS: desvio padrão; %C- Percentagem de citotoxicidade

Fonte: Fonte própria.

Relatos mostram que espécies de plantas que contém citronelol como um dos constituintes químicos, apresentaram atividade antiparasitária. É o caso de *Aloysia triphylla* Britton, conhecida também como *Lippia citriodora*, onde seu óleo essencial foi testado contra *T. cruzi*. Nesta pesquisa realizada por Rojas *et al.* (2012), o óleo essencial de *A. triphylla* em doses de 250 mg / kg produziu uma redução significativa no pico de parasitemia de 85,4% a 22 dpi., observando-se uma redução significativa no número de ninhos amastigotas e infiltrados inflamatórios no tecido do coração, no final da experiência. Outra espécie conhecida como *Cymbopogon citratus*, da família Poaceae, também possui o citronelol em sua composição. Estudos feitos *in vivo* analisaram o efeito antiproliferativo do óleo essencial de *C. citratus*, em todas as três formas evolutivas de *T. cruzi*, através dos macrófagos peritoneais de camundongos. Os resultados mostraram inibição do crescimento

das formas epimastigotas e lise das formas tripomastigotas, além da forte inibição da proliferação de amastigotas intracelulares (SANTORO *et al.*, 2007).

A atividade antiparasitária exibida pelos óleos nos estudos supracitados, entretanto, não podem ser atribuídas ao citronelol, exclusivamente, uma vez que o óleo essencial é uma mistura de diversos constituintes químicos que também podem apresentar efeito contra os parasitas. Neste sentido, o citronelol pode ser considerado um dos contribuintes deste efeito antiparasitário, já que, quando testado isoladamente demonstrou uma atividade moderada.

Conclusões

Após a obtenção dos resultados constatou-se que a substância citronelol, apresentou uma moderada atividade tripanocida, demonstrando, entretanto, elevada citotoxicidade, exercendo um efeito tóxico maior sobre as células de mamíferos do que sobre as parasitárias. Este foi o primeiro relato da atividade tripanocida e citotoxicidade do citronelol.

Referências

BUCKNER F.S. *et al.*, Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 2592 - 2597, 1996.

DUNKEL F.V.; SEARES, L.J., Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Sp. Vaseyana (Rydb) battle for store grain insects. *Journal of Stored Products Research*, v.34, n. 4, p. 307 - 221, 1998.

NEVES D.P. **Parasitologia humana**. 11^a ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2004.

ROJAS J.; PALACIOS O.; RONCEROS S., Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, v. 29, n. 1, p. 61 - 68, 2012.

RÓLON M. *et al.* Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 28, p. 104 - 109, 2006

SANTORO G.F., *et al.* Anti-proliferative effect of the essential of *Cymbopogon citratus* Stapf on intracellular amastigotes, bloodstream tripomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v.134, p. 1649 - 1653, 2007.

SIMÕES C.M.O. *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a Ed.. Porto Alegre/Florianópolis: Editora/UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fish WHO report on neglected diseases working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2010.

VEGA C. *et al.*, A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigota