

## ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE PLANTAS PROVENIENTES DO ESTADO DO CEARÁ

VILA-NOVA, N. S.<sup>1\*</sup>; MORAIS, S. M. DE<sup>2</sup>; MACHADO, L. K. A.<sup>3</sup>; SOARES, B. V.<sup>4</sup>; MAGALHÃES, D. V.; ACCIOLI, M. P.<sup>6</sup>; ANDRADE JR, H.F DE<sup>7</sup>; BEVILAQUA, C. M. L.<sup>8</sup>

### RESUMO

Leishmanose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de protozoário do gênero *Leishmania* e, a quimioterapia utilizada no tratamento tem como base medicamentos que possuem metais pesados tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de plantas encontradas no estado do Ceará, utilizadas na medicina popular para o tratamento da leishmaniose. Foram estudadas a *Annona squamosa*, *Annona muricata* e *Anacardium occidentale*. Destas foram extraídos compostos químicos, acetogeninas, alcalóides e flavonóides. Foram realizados testes *in vitro* utilizando-se cepas de *Leishmania chagasi*. Para os ensaios foram utilizadas as formas extra e intracelulares de *L.chagasi*, as promastigotas e amastigotas. Para os teste de citotoxicidade utilizado células RAW 274. O MTT foi usado no teste colorimétrico, onde indica o índice de células sobreviventes devido a produção de cristais de formazan pela mitocôndria. O extrato mais efetivo contra promastigotas de *Leishmania chagasi*, foi o rico em acetogeninas das folhas de *A. squamosa* com CE50 de 26,43µg/ml, seguido da fração de acetogeninas obtida das sementes de *A. muricata* com CE50 54,93µg/ml e do extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squamosa* com CE5073,31µg/ml. O extrato rico em flavonóides da *A. occidentale* não mostrou efeito significativo. O extrato bruto das sementes de *A.muricata* foi o único com atividade contra amastigotas. A citotoxicidade mostrou-se relevante nos extratos em estudo.

**Palavras chave:** citotoxicidade, formazan, leishmanicida, medicina popular,

### LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS FROM THE STATE OF CEARÁ

#### ABSTRACT

Leishmanose is a disease caused by at least 17 species of protozoa of the genus *Leishmania* and chemotherapy used to treat leishmaniasis is based on use drugs that have toxic heavy metals. The objective of this study was to evaluate the activity leishmanicida of plants found in the state of Ceara, where are used in popular medicine for the treatment of leishmaniasis. The plants studied were the *Annona squamosa*, *Annona muricata* and *Anacardium occidentale*. Of these chemical compounds were taken as acetogenins, alkaloids and flavonoids. The tests were performed *in vitro* using a strain of *Leishmania chagasi*. For the tests were used forms of intracellular and extracellular *L.chagasi* called promastigotes and amastigotes. For the cytotoxicity assay was used RAW 274 cells. The MTT was used in colorimetric test, which indicates the index of cells survived because the production of formazan crystals in the mitochondria. The extract more effective against promastigotes of *L. chagasi*, is rich in acetogeninas of the leaves of *A. squamosa* with EC50 of 26.43 µ g / ml, followed by the fraction of acetogeninas obtained seeds of *A. muricata* with EC50 54.93 µ g / ml and the extract rich in alkaloid from the leaves of *A. squamosa* with CE5073, 31 µ g / ml. The extract rich in flavonoids of *A. occidentale* showed no significant effect. The crude extract of *A. muricata* seeds was the only one who showed activity against amastigotes. The cytotoxicity was relevant in the studied extracts.

**Key words:** cytotoxicity, formazan, leishmanicidal, popular medicine,

<sup>1\*</sup>Méd. Vet.; Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UECE/Fortaleza-CE. E-mail: [nadia.vilanova@hotmail.com](mailto:nadia.vilanova@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professora Titular do Curso de Química da UECE e do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Campus do Itaperi, Avenida Paranjana, 1700, CEP: 60.740-903 – Fortaleza, CE. E-mail: selene@uece.br

<sup>3</sup>Graduanda Química – UECE/Fortaleza-CE. E-mail: [lya\\_karla@hotmail.com](mailto:lya_karla@hotmail.com)

<sup>4</sup>Méd. Vet.; Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UECE/Fortaleza-CE. E-mail: [drbrunasoares@yahoo.com.br](mailto:drbrunasoares@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Químico; Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UECE/Fortaleza-CE. E-mail: [davi\\_varela@hotmail.com](mailto:davi_varela@hotmail.com)

<sup>6</sup>Méd. Vet.; Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UECE/Fortaleza-CE. E-mail: [marinaparissi@bol.com](mailto:marinaparissi@bol.com)

<sup>7</sup>Instituto de Medicina Tropical, Protozoologia. USP/São Paulo. Email: [hfandrad@usp.com](mailto:hfandrad@usp.com)

<sup>8</sup>Professor Adjunto Faculdade de Veterinária da UECE. Campus do Itaperi, Avenida Paranjana, 1700, CEP: 60.740-903 – Fortaleza, CE. E-mail: [claudiamlb@yahoo.com.br](mailto:claudiamlb@yahoo.com.br)

## INTRODUÇÃO

Leishmanose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de protozoário do gênero *Leishmania* (CROFT E COOMBS, 2003). As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito, e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (ASHFORD et al., 1992). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88 países são afetados, compreendendo 12 milhões de pessoas infectadas, colocando em risco de contaminação outros 350 milhões de pessoas (OSÓRIO et al, 2007).

A quimioterapia utilizada no tratamento da leishmaniose é baseada na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimoniatos, entre eles os mais usados são o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (Pentostan®). Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outros medicamentos como Pentamidina e Anfotericina B também são utilizados. Todos esses medicamentos são de administração injetável e requerem supervisão clínica ou hospitalização devido a severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACAB AND PENA-RODRIGUEZ, 2001). Assim o tratamento da leishmaniose não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, a resistência a drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas às drogas existentes também dificultam o tratamento (OSÓRIO et al, 2007). A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CARVALHO AND FERREIRA, 2001). Plantas que são usadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários vêm recebendo considerável atenção em pesquisas na procura de novas drogas com atividade antiparasitária (TEMPONE et al, 2005), onde os extratos e derivados de plantas podem prover uma imensa fonte de agentes medicinais (ROCHA et al, 2005). Em locais endêmicos, devido a dificuldade ao acesso de medicamentos, vários pacientes acabam utilizando tratamentos populares para aliviar os sintomas, muitas vezes esses tratamentos também são utilizados juntamente como o tratamento tradicional (CHAN-BACAB AND PENA-RODRIGUEZ, 2001). Alguns metabólitos secundários encontrados em plantas vêm sendo estudados no tratamento de doenças parasitárias, incluindo alcalóides e acetogeninas presentes em plantas da família das Annonaceae (TEMPONE et al, 2005; OSÓRIO et al, 2007). As plantas utilizadas neste estudo foram *Annona squamosa* L. (folhas), *Annona muricata* L. (folhas e sementes) e *Anacardium occidentale* L. (folhas) que foram coletadas na cidade de Fortaleza-CE.

O objetivo deste estudo foi comprovar a efetividade in vitro de extratos de plantas regionais utilizadas na medicina popular no tratamento da Leishmaniose Visceral (LV), assim como a identificação de seus constituintes químicos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção dos Alcalóides**

Dois quilos de folhas e sementes de *A. squamosa* e *A. muricata* foram colocadas em contato com etanol 96%, durante 1 semana. Após este período o material foi filtrado e o solvente evaporado obtendo-se o extrato etanólico. Este foi lavado com hexano para remoção do material graxoso e clorofila e então alcalinizado com hidróxido de amônia, até atingir pH 9. Foram feitas várias lavagens com diclorometano até obter reação negativa com Dragendorff que indica ausência de alcalóides. O extrato com diclorometano foi seco com sulfato de sódio anidro e este solvente evaporado em evaporador rotatório (TEMPONE et al, 2005).

### **Obtenção das acetogeninas**

Inicialmente as folhas e sementes da *A. squamosa* e *A. muricata* foram secas e maceradas e colocadas em contato com metanol e água a 10%, durante 1 semana. Em seguida a metodologia utilizada foi semelhante à descrita anteriormente até a lavagem com diclorometano. O diclorometano foi evaporado, obtendo-se assim o extrato rico em acetogeninas (WAECHTER et al, 1998).

### **Obtenção de flavonóides**

Para o material vegetal do *A. occidentale* foi utilizado a mesma metodologia descrita para obtenção de alcalóides até a evaporação da solução etanólica (do etanol). Esta solução foi mantida na geladeira (4°C) por dois dias, após esse tempo, foi filtrada o filtrado e precipitado submetidos parcionamentos com n-hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção dos respectivos extratos (BRAGA et al, 2007).

### **Testes de sensibilidade**

#### *Promastigotas*

Em placas de 96 poços foram adicionadas promastigotas na concentração de 106 cel/ml e as drogas testadas, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/ml. Pentamidina foi utilizada como droga controle. As placas foram encubadas por 24 horas a 24°C e as concentrações testadas em triplicatas e repetidas três vezes. A viabilidade das células foi testada usando o método colorimétrico MTT (difeniltetrazolium). A densidade óptica (DO) foi determinada utilizando Multiskan MS (UNISCIENCE) a 570 nm (TEMPONE et al, 2005).

#### *Amastigotas*

Em placas de 96 poços colocou-se Células RAW 274 na concentração de 1.104 cel/poço e adicionou-se promastigotas na proporção de 10:1. Os extratos foram testados na concentração de 100 µg/ml, as placas foram encubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C. Glucantime® foi utilizado como droga controle. Inicialmente colocou-se metanol em todos os poços para a fixação das células e realização da coloração de Giemsa para observação ao microscópio. Para verificar a presença dos

parasitas fez-se a identificação *in situ*, e leu-se a DO a 492nm para identificar a inibição de crescimento (PIAZZA et al, 1994).

### *Citotoxicidade*

Células RAW 274 foram colocadas em placas de 96 poços na concentração de 1.104 cel/poço. Os extratos foram testados na concentração de 100 µg/ml, após 24 horas as placas foram coradas com Giemsa para observação celular no microscópio. Após observação, metanol foi adicionado e a absorbância mensurada com os filtros de 620 e 414nm (GUTIÉRREZ et al., 2007)

### **Análise Estatística**

Para análise estatística empregou-se o programa GraphPad Prism 4.0, utilizando Anova one way com significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Três dos extratos testados mostraram efeito leishmanicida contra a forma promastigota de *L. chagasi*. O extrato mais efetivo foi o rico em acetogeninas das folhas de *A. squamosa* com CE50 de 26,43 µg/ml, seguido da porção acetogeninas extraída das sementes de *A. muricata*, CE50 54,93 µg/ml e do extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squamosa*, CE50 73,31 µg/ml. A pentamidina foi usada como droga referência para o controle e possui uma CE50 de 1,63 µg/ml, sendo esta utilizada na comparação com os extratos em estudo. Plantas produtoras de flavonóides e acetogeninas vêm mostrando estudos promissores com resultados na atividade contra protozoários; entre estas destacam-se as das famílias Anacardiaceae e Annonaceae. As acetogeninas além de leishmanicida também possuem atividades biológicas relatadas na literatura como, por exemplo, antitumoral, imunossupressor, pesticida, antiprotozoário, antihelmíntico e antimicrobiano, o que fez deste constituinte bioativo objeto de inúmeras pesquisas. Sobre as acetogeninas, foi relatado que podem inibir seletivamente o crescimento de células cancerosas e também inibir o crescimento de células tumorais resistentes, demonstrando extraordinária seletividade entre certas linhagens celulares, especificamente, contra câncer prostático. Mais de 80 diferentes tipos de acetogeninas são comumente encontrados nas folhas, raízes e sementes de Annonaceae. (OSÓRIO, 2007). O mecanismo de ação das acetogeninas não foi totalmente esclarecido, acredita-se que sua atividade leishmanicida esteja relacionada com o número de grupos hidroxila presentes na sua estrutura química (CHAN-BACAB AND PENA-RODRIGUEZ, 2001). Alcalóides possuem várias funções no combate da sífilis, lepra, gonorréia e malária. Também vem sendo reportado seu efeito antihelmíntico, antiinflamatório, antitumoral, analgésico entre outros, estes alcalóides também são encontrados nas plantas da família Annonaceae. O mecanismo de ação dos alcalóides está relacionado com a habilidade deste grupo em se intercalar com o DNA do parasita (TEMPONE et al, 2005). *A. occidentale* vem sendo usado pela população produtora de coco na costa da Bahia no tratamento de leishmaniose. No entanto neste estudo não constatou efeito leishmanicida nas formas intra e extra celular de *L. chagasi*, porém foi detectado um aumento na quantidade de parasitas viáveis, o que sugere a presença de constituintes químicos capazes de induzir o aumento da quantidade de parasitas viáveis. Assim os compostos fenólicos extraídos da folha do *A. occidentale* não se mostraram ativos contra as formas infectantes de *L. chagasi*, tal fato também observado no uso de extrato metanólico desta mesma planta (BRAGA et al, 2007).

Neste estudo apenas o extrato bruto das sementes de *A. muricata* mostrou efeito significativo contra a forma intracelular amastigota, reduzindo o parasita em 11,11% na dose de 100 µg/ml. A droga padrão usada no controle de amastigotas (Glucantime®) reduziu a carga parasitária em 12% na dose de 30 µg/ml e em 100% na dose de 300 µg/ml. A forma amastigota é a de maior relevância clínica, porém o estudo com promastigotas é importante já que este permite uma avaliação inicial entre os compostos a serem estudados. A diferença dos resultados entre as formas extracelular promastigota e intracelular amastigota são esperados devido diferente localização intra e extra celular, metabolismo da droga, mecanismo de ação, entre outros (TEMPONE et al, 2005).

O extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squamosa* mostrou citotoxicidade de 7,97 µg/ml, o extrato rico em acetogeninas das folhas de *A. squamosa* foi de 4,35 µg/ml, e a porção de acetogeninas extraída das sementes de *A. muricata* de 17,09 µg/ml. O extrato bruto das sementes de *A. muricata*, o único que mostrou efeito contra a forma amastigota, possui uma toxicidade de 10,2 µg/ml, e o extrato das folhas de *A. occidentale* possui uma toxicidade de 21,86 µg/ml. A pentamidina mostrou uma toxicidade intermediária (18,40 µg/ml), quando comparada aos extratos estudados. O Glucantime® não mostrou efeito significativo. Todos os dados foram confirmados por comparação com o grupo controle (sem drogas), utilizando microscópio óptico.

## CONCLUSÃO

O extrato rico em alcalóides e o rico em acetogeninas das folhas da *A. squamosa*, o extrato rico em acetogeninas das sementes da *A. muricata*, mostraram resultados significativos na diminuição in vitro da viabilidade das formas promastigotas de *L. chagasi*.

Apenas o extrato bruto das sementes de *A. muricata* mostrou efeito significativo contra a forma amastigota.

O extrato de *A. occidentale* não mostrou efeito leishmanicida.

Estudos posteriores para determinação dos constituintes químicos destes extratos são importantes para a descoberta dos seus princípios ativos, assim como estudos in vivo são de importância fundamental para uma futura sintetização de novas drogas.

## REFERÊNCIAS

- ASHFORD, D.A.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 8, p. 104-105, 1992.
- BRAGA; F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L., MATOS, M. DE O., MOREIRA, F.O., SCIO, E., COIMBRA, E.S., Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p. 296-402, 2007.
- CARVALHO, P.B.de; FERREIRA, E.I, Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, v. 72, p. 599-618, 2001.
- CHAN-BOCAB, M.J.; PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanial activity. *The royal society of chemistry*, v. 18, p. 674-688, 2001.
- CROFT, S.L; COOMBS, G.H; Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advancing the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

PIAZZA, R.M.F; ANDRADE JR; H.F DE; UMEZAWA, E.S; KATZIN; A.M; STOLF; A.M.S. In situ immunoassay for the assessmet of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. *Acta Tropica*, v.57 p. 301-306, 1994.

OSORIO, E., ARANGO G.J; JIMÉNEZ, N; ALZATE, F; RUIZ, G; GUTIÉRREZ, D; PACO, M.A; GIMÉNEZ, A; ROBLEDO, S; Antiprotozoal and cytotoxic *in vitro* of Colombian Annonacea. *Journal od Ethnopharmacology*, v.111, p. 630-635, 2007

TEMPONE, A.G; BORBOREMA, S.E.T; ANDRADE Jr, H.F.de; GUALDA; N.C.de A; YOGI; A; CRAVALHO; C.S; BACHIEGA; D; LUPO; F.N; BONOTTO; S.V; FISCHER; D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. *Phytomedicine*, v.12, p. 382-390, 2005.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S; MACÊDO, R.O; BARBOSA-FILHO, J.M; A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v.12, p. 514-535, 2005.