

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Annona squamosa*, *Annona muricata* e *Anacardium occidentale*.

¹Denise Damásio Cavalcante, ²Nadja Soares Vila-Nova

1. Aluna do curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – FACENE, denisemedvet@hotmail.com
2. Docente Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – FACENE, nadja.vilanova@hotmail.com

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de plantas encontradas no estado do Ceará onde são utilizadas na medicina popular no tratamento da Leishmaniose Visceral. A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose característica regiões tropicais e subtropicais do mundo causado por um protozoário *Leishmania infatum chagasi*. Acomete além do homem, canídeos, felídeos, roedores e marsupiais, sendo transmitida pelo flebótomo *Lutzomia longipalpis*. A observação das propriedades terapêuticas de vegetais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais. Metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, considerados no passado como inativos são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica. As plantas estudadas foram a *Annona squamosa* (popularmente conhecida como pinha, ata ou fruta do conde), *Annona muricata* (popularmente conhecida como graviola) e *Anacardium occidentale* (popularmente conhecida como caju). Os testes foram realizados *in vitro* utilizando cepa de *Leishmania chagasi* e para os ensaios foram utilizadas as formas extra-celulares chamadas de promastigotas. Utilizando-se o método colorimétrico MTT para avaliação da efetividade do fitoterápico em estudo contra promastigotas 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 26,43 µg/ml, seguindo da fração de acetogeninas obtida das sementes de *A. muricata* com CE₅₀ 54,93 µg/ml e do extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squamosa* com CE₅₀ 73,31 µg/ml. O extrato rico em flavonóides da *A. occidentale* não mostrou efeito significativo.

Palavras chave: Leishmanicida, promastigotas, medicina popular, Annonaceas

INTRODUÇÃO:

Leishmanose é uma doença causada por pelo menos por 17 espécies de um protozoário do gênero *Leishmania* (CROFT, S.L; COOMBS, G.H., 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 medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimônios, entre eles os mais usados são o antimônio 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, P.B; FERREIRA E.I, 2001).

Plantas que são usadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários vêm recebendo considerável atenção em pesquisas na procura 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-BOCAB, M.J; PENA-RODRÍGUEZ, L.M., 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 Annonáceas (TEMPONE et al, 2005; OSÓRIO et al, 2007). As plantas utilizadas neste estudo foram *Annona squamosa* L. (folhas), *A. muricata* L. (folhas e sementes) e *A. 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. 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 10^6 cel/ml e as drogas testadas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/ml}$, Pentamidina foi utilizada como droga controle. As placas foram encubadas por 24 horas a 24°C , cada concentrações testadas em triplicatas e o ensaio repetido 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 colocaram-se Células RAW 274 na concentração de 1.10^4 cel/poço e adicionado promastigotas na proporção de 10:1. Os extratos foram testados na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ e as placas encubadas por 24 horas em estufa de CO_2 à 37°C . Glucantime foi utilizado como droga controle. Inicialmente colocou-se metanol em todos os poços para que ocorresse a fixação das células e feito 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 1.10^4 cel/poço. Os extratos foram testados na concentração de 100 $\mu\text{m/ml}$, 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)

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Três 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 CE_{50} de 26,43 $\mu\text{g/ml}$, seguindo da porção acetogeninas extraída das sementes de *A. muricata*, CE_{50} 54,93 $\mu\text{g/ml}$ e do extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squamosa*, CE_{50} 73,31 $\mu\text{g/ml}$, a pentamidina foi usada como droga referência para o controle e possui uma CE_{50} de 1,63 $\mu\text{g/ml}$, esta foi utilizada na comparação com os extratos em estudo.

Plantas produtoras de flavonóides e acetogeninas vem mostrando estudos promissores com resultados 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, anti-helmíntico 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 Anonáceas. (OSÓRIO, 2007). O mecanismo de ação das acetogeninas não foram totalmente esclarecidos, 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 sido reportado seu efeito anti-helmíntico, anti-inflamatório, antitumoral, analgésico entre outros

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 na população produtora de coco na costa da Bahia no tratamento de leishmaniose, no entanto neste estudo não constatou-se efeito

leishmanicida nas formas intra e extra celular de *L.chagasi*, porém foi detectado um aumentando 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 pois este permite uma avaliação inicial entre os compostos a serem estudados. A diferença dos resultados entre as formas extracelular promastigotas e intracelular amastigotas são esperados devido diferente localização intra e extracelular, metabolismo da droga, mecanismo de ação, entre outros (TEMPONE et al, 2005).

O extrato rico em alcalóides das folhas de *A. squomosa* mostraram um citotoxicidade de 7,97 µg/ml o extrato rico em acetogeninas das folhas de *A. squomosa* foi de 4,35 µg/ml e a porção de acetogeninas extraída das sementes de *A. muricata* 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. 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

Visando a obtenção de produtos naturais com atividades leishmanicidas foram realizados procedimentos químicos para isolamento e obtenção de derivados de produtos naturais abundantes seguidos da avaliação das suas atividades leishmanicida contra as formas promastigota de *L. chagasi*. 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.

A ação leishmanicida de alcaloides, acetogeninas, e flavonoides, abordados neste trabalho abrem possibilidades para novos tratamentos, no entanto 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, R.W et al. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today** , [S.l.], v. 8, n. 3, p. 104-105, mar. 1992.

BRAGA, F.G et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** , [S.l.], v. 111, n. 2, p. 396-402, maio. 2007.

CARVALHO, P.B; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia** , [S.l.], v. 72, n. 6, p. 599-618, ago. 2001.

CHAN-BOCAB, M.J; PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanial activity. **The royal society of chemistry** , Reino Unido, v. 18, p. 674-688, out. 2001.

CROFT, S.L; COOMBS, G.H. Leishmaniasis ? current chemotherapy and recent advancing the search for novel drugs.. **Trens in Parasitology** , [S.l.], v. 19, n. 11, p. 502-508, nov. 2003.

TEMPONE, A.G et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. . **Phytomedicine** , [S.l.], v. 12, n. 5, p. 382-390, maio. 2005.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic in vitro of Colombian Annonacea. **Journal od Ethnopharmacology** , [S.l.], v. 111, n. 3, p. 630-635, maio. 2007.

PIAZZA, R.M.F et al. In situ immunoassay for the assessment of Trypanosoma cruzi interiorization and growth in cultured cells. **Acta Tropica** , [S.l.], v. 57, n. 4, p. 301-306, set. 1994.

ROCHA, L.G et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** , [S.l.], v. 12, n. 6-7, p. 514-535, jun. 2005.