

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FRUTOS E EPICARPO DE CAESALPINIA FERREA MARTIUS (FABALES: CAESALPINIACEAE) CONTRA Leishmania SPP. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

Josephine MUELAS¹; Alana C. VINHOTE-SILVA³; Claudia COMANDOLLI-WYREPKOWSKI³; Antonia M. R. FRANCO²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPCS/INPA; ³Colaboradora CPCS/INPA

1. Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo se manifestar através de diferentes formas clínicas. É considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas. As principais manifestações observadas nos pacientes com LTA podem ser classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos. A doença pode apresentar-se na forma cutânea, muco-cutânea, visceral ou difusa (Carvalho *et al.*, 1994).

O tratamento padrão para pacientes acometidos com Leishmaniose é o uso de antimoniais pentavalentes, como o Glucantime (antimoniato de N-metilglucamina), porém esse se mostra de certa forma ineficaz contra algumas espécies de *Leishmania* pela resistência e com a possibilidade de recidivas nas formas muco-cutâneas. Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, mas alguns efeitos colaterais podem ocorrer como dor no local da injeção, disfunção gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite. Como alternativa para o tratamento podem também ser usados o isotianato de pentamidina ou a anfotericina B (Gasser *et al.*, 1994; Lainson & Shaw, 1978, BRASIL, 2006).

Com o intuito de buscar novas substâncias bioativas mais eficazes contra os protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e com menor toxicidade, vem sendo realizado estudos com extratos de substâncias derivadas de vegetais, com grande ênfase em espécies que já vem sendo utilizadas etnofarmacologicamente (Ganesan, 2002). Entre estas espécies destaca-se o Jucá (*Caesalpinia ferrea*, escolhido para estes estudos por ser utilizado pela população como cicatrizante, e por ter apresentado atividade leishmanicida (Cortez, 2004; Falcão, 2010). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a atividade "in vitro" de frutos e epicarpós de *C. ferrea* Martius (Fabales: Caesalpinaceae) contra *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae).

2. Material e Métodos

Para os testes preliminares, de infecção em macrófagos, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus*. Camundongos jovens foram anestesiados, sensibilizados e realizada uma assepsia na região abdominal, em seguida feita uma incisão longitudinal na região do abdome, injetando-se cerca de 5 mL de meio RPMI s/ SFB, após suave massagem abdominal, foi coletado o exsudato peritoneal. Em seguida foi realizada a quantificação dos macrófagos, ajustando-se para 5×10^5 macrófago/mL, desta forma, estes foram plaqueados em placa (Fig. 1) de poliestileno (NUNCLON™) contendo lamínulas de 22x22 mm e incubados a 37°C (Fig.2), com 5% de CO₂ por 24 h. Após 24h, foi realizada a infecção (Fig. 2) com formas promastigotas recém-isoladas de *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) quantificadas em câmara de Neubauer, ajustadas para a proporção de 10:1 parasito/macrófago. Seguido a incubação celular por 24h, sob as mesmas condições, foi administrado em diferentes concentrações o extrato (hidroalcolico) metanólico de epicarpo (Fig. 1) de *C. ferrea*. O conteúdo dos poços 24h após a incubação com o extrato hidroalcolico foi aspirado e as lamínulas coradas com Kit Panótico (LABORCLIN) e observadas em microscópio em aumento de 1000x.

Para os testes seguintes de viabilidade celular com promastigotas, foi utilizado protocolo segundo Cortez (2004). Primeiramente, foram amplificadas e quantificadas as suspensões

contendo promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/11/IM5584), Pentamidina (Pentacarinat®/50mg/mL) diluída em meio RPMI completo, DMSO (Dimetil sulfóxido/Vetec) diluído em meio RPMI, e ambos os extratos também diluídos em meio RPMI completo. Os flagelados foram amplificados em garrafas de cultivo, em meio RPMI completo com SFB a 10% e mantidos em cultivo em temperatura a 24°C por 5 dias após o inoculo. Para o experimento, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e ajustados para 10⁷ promastigotas/mL. Os extratos utilizados foram obtidos dos frutos e do epicarpo de Jucá (*C. ferrea*) separadamente e diluídos para a realização dos bioensaios nas concentrações obtidas por diluição seriada de 20mg/mL a 0,62mg/mL. A análise dos ensaios nas microplacas foram realizados, pela quantificação das formas promastigotas em câmara de Neubauer utilizando-se azul de Trypan como corante vital e pelo uso do kit de sal de tetrazolium MTT (Roche®) 24 horas a 25°C após exposição dos flagelados as diferentes concentrações dos extratos. O protocolo utilizado para a avaliação da atividade dos extratos pelo uso do método colorimétrico com sal de tetrazolium MTT foi feito de acordo com o manual. Todos os testes foram realizados em duplicata. A placa foi incubada "overnight" sob a mesma condição. Após o período de incubação foi feita a leitura da placa no espectrofotômetro, com filtro de 490nm.

3. Resultados e Discussão

No ensaio com formas amastigotas de *L. guyanensis*, apenas foi possível realizar a infecção dos parasitos com os macrófagos murinos. Foi estabelecido um padrão de condições nas quais os macrófagos melhor se adaptaram (temperatura em torno de 35°C) num período de incubação antes da infecção de 4 a 7 dias, verificando-se a viabilidade das células em até 14 dias. Os bioensaios realizados com o intuito de comparar a atividade dos extratos brutos metanólicos dos frutos íntegros de *C. ferrea* exibiram atividade nas concentrações utilizadas principalmente na concentração de 20mg/mL com atividade em torno de 69%, decaindo conforme as concentrações eram reduzidas (Fig. 4). Já no que diz respeito a atividade leishmanicida do epicarpo, os ensaios biológicos realizados com o intuito de comparar a atividade destes extratos com a atividade dos frutos íntegros de *C. ferrea* demonstraram uma maior atividade do epicarpo, observando-se sua atividade em todas as concentrações utilizadas sendo que de forma mais eficaz nas maiores concentrações (Fig. 5). Concomitante aos bioensaios foi realizado os testes com o kit colorimétrico com sal de tetrazolium MTT, na tentativa de padronizar o método *in vitro* facilitando assim a realização dos ensaios sem a necessidade de avaliar a atividade de extratos utilizando-se a quantificação de formas promastigotas pela contagem em camara de Neubauer. Os testes com o MTT são testes semi automatizados e baseiam-se na clivagem dos sais de tetrazolium MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) pelas enzimas mitocondriais succinato desidrogenase, num produto colorido denominado de formazan. A quantidade de formazan produzida é a medida direta das células viáveis. Os resultados observados em um dos ensaios com uso do kit demonstrou que houve reatividade inespecífica do reagente tetrazolico com compostos como o vermelho fenol que existem no meio de cultivo RPMI. Este é utilizado no meio de cultivo como um indicador de pH com altos valores de absorbância, agindo como background no teste. Desta forma o meio utilizado nos bioensaios é de extrema importância quando se faz uso de métodos colorimétricos como o aqui testado (Dutta *et al.*, 2005). Mesmo tendo sido observada reatividade inespecífica o uso de testes colorimétricos geralmente são convenientes e economicamente viáveis nos bioensaios, pois favorecem a realização de inúmeros testes com diversos compostos em ensaios biológicos, principalmente na busca de drogas aplicadas ao uso terapêutico.

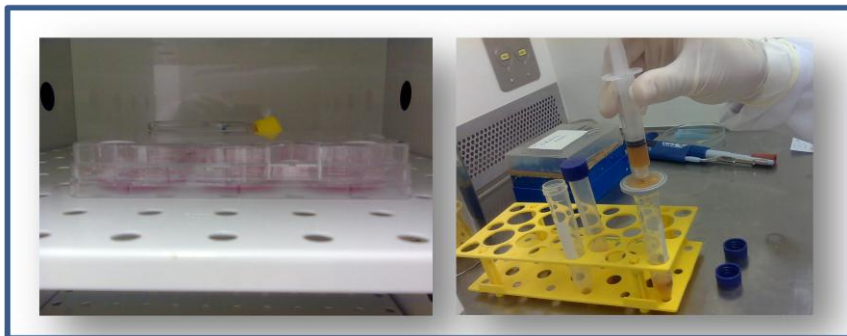


Figura 1 - Placa de poliestileno de seis poços contendo macrófagos murinos peritoneais e filtragem de extrato de *Caesalpinia ferrea* diluído.

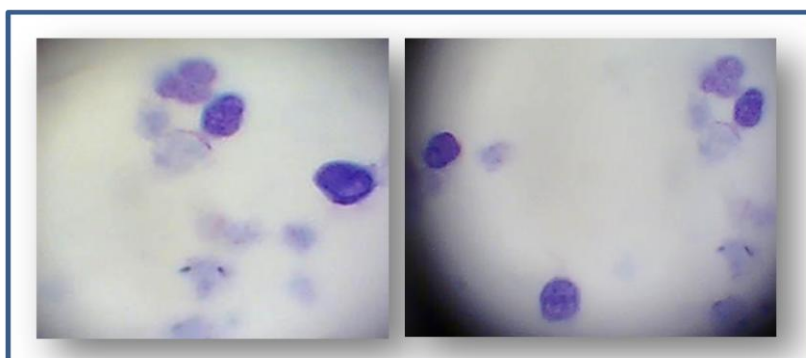


Figura 2 - Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, da espécie *Mus musculus* cultivados em meio de cultivo RPMI completo, grupo controle dos experimentos.

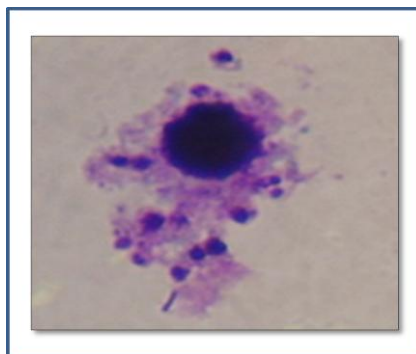


Figura 3 - Macrófago peritoneal de camundongo BALB/c, da espécie *Mus musculus* cultivados em meio de cultivo RPMI completo infectado com *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

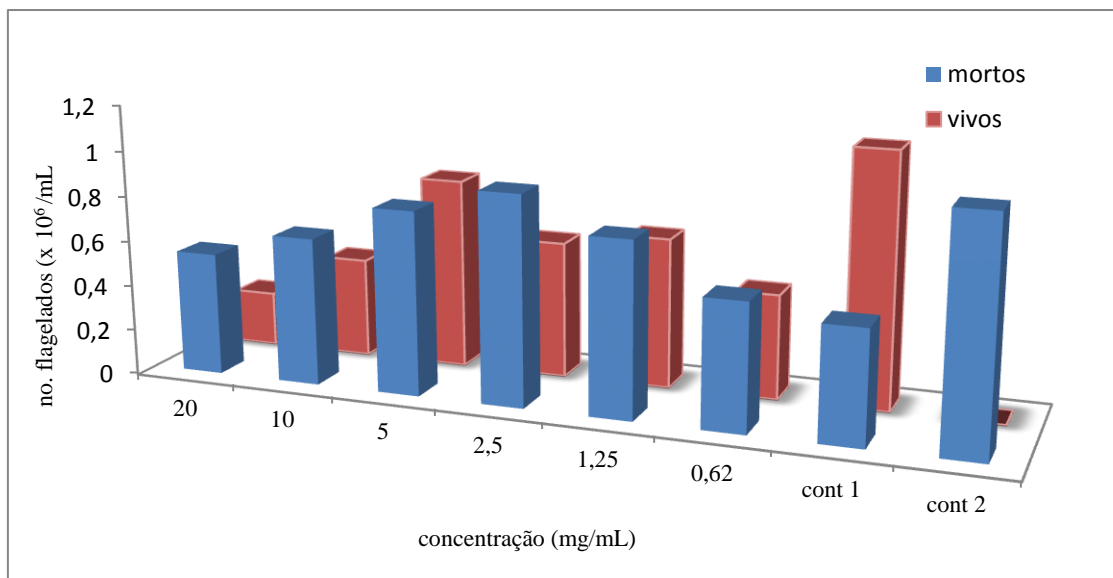


Figura 4 - Quantificação das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mortas e vivas em presença de extrato metanólico do fruto de *Caesalpinia ferrea* por 24 horas. Cont = controle; 1: promastigotas em meio de cultivo RPMI completo; 2: promastigotas em meio de cultivo RPMI completo com pentamidina.

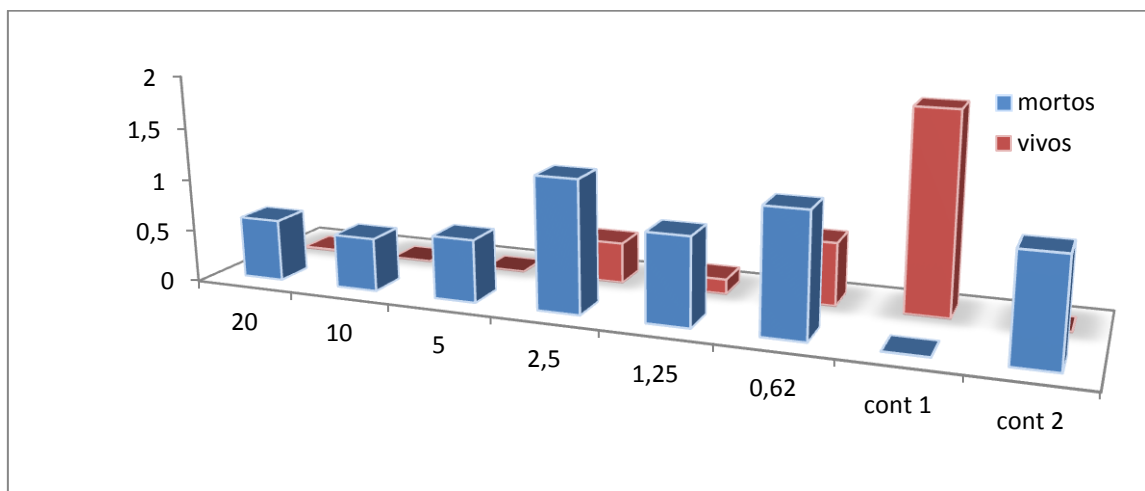


Figura 5 - Quantificação das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vivas em presença por 24 horas com extrato metanólico do epicarpo de *Caesalpinia ferrea*. Cont = controle; 1: promastigotas em meio de cultivo RPMI completo; 2: promastigotas em meio de cultivo RPMI completo com pentamidina.

4. Conclusão

Verificou-se atividade leishmanicida *in vitro* de *C. ferrea* (extratos hidroalcolícos de epicarpo e fruto íntegros) contra *L. amazonensis*. Sendo o extrato de epicarpo o mais eficaz, com atividade leishmanicida a 100% nas três maiores concentrações (20mg/mL, 10mg/mL e 5mg/mL), diferentemente do extrato dos frutos íntegros, que em sua maior concentração alcançou taxa de mortalidade de apenas 69% dos parasitas. Mais estudos estão sendo realizados para avaliar a citotoxicidade dos extratos.

5. Referências

BRASIL, 2006 Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo 120pp

Carvalho, E.M, Barral A., Costa J.M.L., Bittencourt A., Marsden P.. 1994 Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56: 315-25.

Cortez, A. C. A. 2004. *Avaliação da atividade "in vitro" dos extratos fitoquímicos de Caesalpinia ferrea Martius e Senna reticulatta (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Caesalpinaceae) para Leishmania spp. e Trichophyton spp.* Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus-AM 80pp

Dutta, A., Bandyopadhyay S., Mandal C., Chatterjee M.,. 2005 Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis *Parasitology International* 54: 119-122.

Falcão, N.M.S. 2010. *Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra Leishmania (Viannia) guyanensis (Kinetoplastida Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de Caesalpinia ferrea Martius (Fabales: Caesalpinaceae)* Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 82 pp.

Ganesan, A. 2002. Recent developments in combinatorial organic synthesis. *DrugDiscov Today.* 1: 47-55.

Gasser, J.R.R.A, Magil, A.J., Oster N., Franke E.D., Grogl M., Bernan J.D. 1994. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*, 18: 83-90.

Lainson, R.; Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis. *Acad. Press Inc.*, p. 100-128.