ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM10

ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE *Prosopis juliflora* (SWARTZ)

SILVA, C. C.¹; SILVA, A. C. M. S.¹; SILVA-LACERDA, G. R.²; SILVA, K. M. P.²; C. M. B.
OLIVEIRA-JUNIOR³; G. M. CAVALCANTE^{2,3}

¹Acadêmicas do curso de Biomedicina da FACULDADE UNINASSAU-CARUARU.

²Docentes do curso de Biomedicina da FACULDADE UNINASSAU-CARUARU.

³Universidade de Pernambuco (UPE), Campus Santo Amaro, Centro de Ciências Biológicas.

E-mail para contato: camilacassia1997@hotmail.com

RESUMO – As leishmanioses são infecções causadas por uma variedade de espécies do gênero *Leishmania*, e é transmitida ao homem por mosquitos flebotômíneos. A quimioterapia é limitada e os fármacos utilizados provocam uma série de efeitos colaterais, além de apresentar altos índices de toxicidade. Na busca de novos agentes foi avaliada *in vitro* o extrato foliar e frações de *Prosopis juliflora* frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O efeito inibidor do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* foi determinado para o extrato bruto da folha e frações orgânicas, em comparação com a pentamidina, utilizada como droga padrão e os efeitos citotóxicos foram avaliados em células de macrófagos linhagem J774 por ensaio MTT-citotoxicidade. O extrato etanólico (EEtOH) e as frações metanólica (FrMeOH) e acetato de etila (FrAcEOt) exibiram resultados significativos contra a formas promastigotas de *L. amazonensis* ($CI_{50}=5,1\pm0,4$ $\mu\text{g/mL}$; $CI_{50}=4,9\pm0,5$ $\mu\text{g/mL}$; $CI_{50}=5,0\pm1,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Os extratos e frações não afetaram a viabilidade celular de macrófagos J774. Estudo químico para a extração e o isolamento de compostos ativos é recomendado, para realização de ensaios *in vitro* de substâncias isoladas de *P. juliflora* frente a *L. amazonensis*.

PALAVRAS-CHAVES: *Prosopis juliflora*. Atividade leishmanicida. Atividade citotóxica.

ABSTRACT: Leishmaniosis is an infection caused by species of *Leishmania*, is transmitted to humans by phlebotomine sandflies. Pentavalent antimonial compounds are used in the chemotherapy of this disease; however, these drugs cause several collateral effects, besides presenting high levels of toxicity. The search for new antileishmanial agents, was investigated *in vitro* the leaf extract and organic fractions of *Prosopis juliflora* against the promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. The growth inhibitory effect of promastigote forms of *L. amazonensis* was determined for the leaf crude extract and organic fractions of the in comparison to pentamidine used as standard drug; and the cytotoxic effects were assessed on macrophage strain J774 by MTT-cytotoxicity assay. Etanolic extracts (EEtOH), Fraction acetate (FrAcEOt) and methanolic (FrMeOH) exhibited

significant result against for promastigotes forms of L. amazonensis ($IC_{50}=5.1\pm0.4$ $\mu\text{g/mL}$; $IC_{50}=4.9\pm0.5$ $\mu\text{g/mL}$; $IC_{50}=5.0\pm1.0$ 4.9 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Extracts and fractions did not affect cell viability of macrophages J774. A chemical study for the extraction and isolation of active compounds is recommended for the in vitro assay of substances isolated from P. juliflora against L. amazonensis.

Keywords: *Prosopis juliflora*. Leishmanicidal activity. Cytotoxic activity.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como negligenciadas, endêmicas em mais de 88 países, tendo em média 12 milhões pessoas vivendo em áreas de risco (ALVAR *et al.*, 2015). Trata-se de uma infecção causada por parasitas do gênero *Leishmania* que são transmitidos por mosquitos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), e que é considerada um grande problema de saúde pública, em virtude dos altos índices de morbidade e mortalidade (GRECCO *et al.*, 2012).

O tratamento desta doença é baseado no uso de antimoniais pentavalentes (Sb+5) como o Glucantime, fármaco de primeira escolha; além de Anfotericina B e Pentamidina. Apesar de várias opções terapêuticas, o tratamento ainda é considerado limitado em virtude do seu alto custo e longo período; além de alta toxicidade do medicamento (SANTOS *et al.*, 2015). Em virtude disso, a OMS tem estimulado as pesquisas com novos agentes leishmanicidas.

Neste contexto, várias substâncias químicas e extratos de plantas são estudados corriqueiramente com a finalidade de encontrar novos agentes leishmanicidas com menor efeito tóxico, ótima biodisponibilidade e baixa capacidade de desenvolvimento de resistência do parasita (SANTOS *et al.*, 2013).

A espécie vegetal *Prosopis juliflora* pertencente à família Mimosaceae, é uma espécie exótica, originária do norte da América do Sul e Central, conhecida popularmente como algaroba, com ampla distribuição na Região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia e Piauí (NASCIMENTO, 2014). Dentre as suas muitas utilizações, é possível destacar suas atividades antimicrobiana (SHACHI-SINGH; VERMA, 2011), antineoplásica (SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2011), antioxidante (NAPAR *et al.*, 2012) e antiplasmodial (RAVIKUMAR *et al.*, 2012).

Com base no amplo espectro de atividades biológicas registradas para a espécie em estudo e a valorização de pesquisas com produtos naturais; além da ineficiência terapêutica, casos de múltipla resistência ao medicamento e ausência de vacinas disponíveis para leishmanioses; o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato etanólico e frações orgânicas de *P. juliflora* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie vegetal foi obtida junto a Estação Experimental do Instituto Agropecuário de Pernambuco (IPA), situada na cidade de Vitória de Santo Antão,

Pernambuco, em março de 2017. Diferentes partes vegetais (folha, flor, fruto e talo) foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e levadas para confirmação e identificação da espécie por profissionais de Botânica. Uma exsiccata foi depositada no Herbário do Instituto Agropecuário de Pernambuco sob o n° IPA7611.

Para a obtenção dos extratos, as folhas foram secas à temperatura ambiente e moídas com auxílio de um moinho. Sete quilos do pó foram misturados com etanol a uma concentração de 70% (v/v) para obtenção do extrato etanólico das folhas (EEtOH). A evaporação do etanol foi realizada utilizando um evaporador rotativo sob vácuo a 30 °C. Após evaporação do solvente, uma alíquota de 50 g de EEtOH foi suspensa na mistura metanol: água (1:1) e o resíduo insolúvel (13,5g) foi removido por filtração. A solução hidroalcoólica foi particionada sucessivamente com hexano e acetato de etila para produzir 3,1 g da fração orgânica hexânica (FrHex), 11,1 g da fração orgânica acetato de etila (FrAcEOt) e 2,6 g da fração residual metanol: água (FrMeOH). Antes da utilização nos ensaios de atividade leishmanicidas e citotoxicidade em células de linhagens J774, o extrato etanólico e as frações orgânicas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido a 0,01% (DMSO 0,01%).

O efeito do extrato e das frações de *P. juliflora* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* foi realizado pelo método de redução de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Formas promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana, na concentração de 1×10^5 células/poço. Diferentes concentrações do extrato e das frações de *P. juliflora* (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL) e do fármaco padrão (Pentamidina) foram adicionados aos poços até a obtenção final de 200 µL. Para controle de crescimento basal foram usados meio de cultura livre de compostos e meio de cultura contendo o solvente utilizado na solubilização do extrato e das frações (DMSO 0,01%). As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 27 °C por 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 20 µL de solução de MTT (2 mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂. Transcorrido o período de incubação, após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 120 µL de Isopropanol. As placas foram mantidas em repouso por 1 hora a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram expressos como a média $\pm$ desvio ($X \pm DP$).

O estudo de viabilidade celular do extrato bruto e das frações foi realizado frente a macrófagos da linhagem J774 pelo método de redução de MTT, conforme descreve a metodologia de Mosmann (1983). Os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço e expostos a diferentes concentrações dos extratos e das frações (0,1, 1, 10 e 100 µg), diluídas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato, por um período de 48 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Como controle de crescimento basal, as células foram cultivadas em meio de cultura livre de compostos, e em meio de cultura contendo DMSO 0,01%, e para o controle de células mortas foi adicionado Triton 1% ao meio RPMI suplementado. Transcorrido o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e logo após foi adicionado 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas por 1 hora em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂. Em seguida, após a retirada do sobrenadante foi adicionado 100 µL de DMSO 0,1% e realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão ($X \pm DP$).

A análise estatística foi realizada com o programa BioEstat 5.0. As diferenças entre os grupos controles e experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$ foi comparado ao grupo controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do EEtOH e das frações FrHex, FrAcEOt e FrMeOH de *P. juliflora* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e a macrófagos da linhagem J774, usando o método de redução de MTT, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeitos da Pentamidina, EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH de *Prosopis juliflora* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos da linhagem J774.

Tratamento	<i>Leishmania amazonensis</i>	Macrófagos J774		
	CI ₅₀ ^a	EM (%) ^b	CI ₅₀ ^c	EM (%) ^d
Pentamidina	2,5±1,0 μM	92,4±0,5 ^{***}	1,5±0,5	91,0±1,0 ^{***}
EEtOH	5,1±0,5 μg/mL	72,6±1,0 ^{**}	>100	NT
FrHex	6,4±1,0 μg/mL	74,6±1,5 ^{**}	>100	NT
FrAcEOt	5,0±1,0 μg/mL	70,1±0,2 ^{**}	>100	NT
FrMeOH	4,9±1,0 μg/mL	71,4±1,2 ^{**}	>100	NT

* Os resultados referem-se: ^aConcentração inibitória a 50% das formas promastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; ^bEfeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1%. ^cConcentração letal a 50% dos macrófagos (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^dMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não apresenta atividade letal significativa para os macrófagos nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

O extrato EEtOH e as frações FrMeOH e FrAcEOt exibiram as atividades leishmanicidas mais significativas, com valores de concentração inibitória mínima (CI₅₀) de 5,1, 4,9 e 5,0 respectivamente. O extrato etanólico e as frações orgânicas de hexano, acetato de etila e metanol-água, não afetaram a viabilidade das células J774, após 48 horas de incubação.

O gênero *Prosopis* inclui 44 espécies que são nativas das Américas do Sul e do Norte, das quais 28 espécies foram registradas como endêmicas destas regiões. Estudos químicos da espécie *P. juliflora* mostraram a presença de substâncias bioativas como alcaloides, flavonoides, terpenos e compostos fenólicos (HENCIYA et al., 2017). Atividades biológicas, incluindo, atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, analgésica e antitumoral, já foram registradas para a espécie *P. juliflora* (SHACHI-SINGH; VERMA, 2011; SATHIYA; MUTHUCHELIAN, 2011; NAPAR et al., 2012; RAVIKUMAR et al., 2012). Foram encontrados registros de atividade antiparasitária desta espécie, porém poucos trabalhos foram encontrados em relação a atividade leishmanicida de *P. juliflora*.

Musayeib et al. (2012), registraram atividade leishmanicida do extrato metanólico das folhas de *P. juliflora* frente a formas promastigotas de *L. infatum* ($CI_{50} = 35 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$). Comparando os resultados desta pesquisa, com os dos autores supracitado, é possível observar que os extratos e frações de *P. juliflora*, apresentaram atividade mais significativa frente à espécie *L. amazonensis*. Segundo Wilson e Pearson (1990), as diferentes espécies do gênero leishmania produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade destes parasitas.

4. CONCLUSÃO

Os resultados para a atividade leishmanicida do extrato etanólico e das frações orgânicas hexânica, acetato de etila e metanol-água oriundos de *P. juliflora*, foram significativos para formas promastigotas de *L. amazonensis*, sem apresentar toxicidade para célula hospedeira. Os resultados promissores sugerem a realização de estudos químicos detalhados, para isolamento de substâncias; bem como a utilização destas em ensaios *in vitro* frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

5. REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VE'LEZ, ID.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOERL, M. WHO *Leishmaniasis* control team. *Leishmaniasis* Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PL On.**, v.7. n.5, p.e35671, 2012.

GRECCO, SS.; REIMÃO, JQ.; TEMPENO, AG.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R LR.; ROMO, FFP.; FERREIRA, RJP.; FAVERO, DA.; LAGO, JH. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonones from *Baccharis retusa* D.C. (Asteraceae). **Exper Parasit**, v.130, v.3, p.141-145, 2012.

HENCIYA S, SETURAMAN P, JAMES AR, TSAI YH, NIKAN R, WU YC, DAHMS, HU, CHANG FR. Biopharmaceutical potentialis of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosae). **Jour of Foo and Drug Anal**, v.25, n.1, p.187-196, 2017.
MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Jour Immun Meth**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUSAYEIB, NM.; MOTHANA, RA.; AL-MASSARANI, S.; MATHEUSSEN, A.; COS, P.; MAES, L. Study of the *in vitro* antiplasmodial, antileishmanicidal and antitrypanosomal activities of medicinal plants from Saudi Arabia. **Moll**, v.17, n.1, p.11379-11390, 2012.

NAPAR, A. A.; BUX, H.; ZIA, A.M.; AHMAD, M. Z.; ROOMI, S.; MUHAMMAD, I.; SHAH, S. H. Antimicrobial and antioxidant activities of mimosaceae plants: *Acacia modesta* Wall, *Prosopis cineraria* (Linn) and *Prosopis juliflora* (Swartz). **Jour of med plant resear**, v.6, n.15, p.2962-2970, 2012.

NASCIMENTO, CE.; TABARELLI, M.; SILVA, CAD; LEAL, IR.; TAVARES, W.; SERRÃO, J. E.; ZANUCIO, JC. The introduce tree *Prosopis juliflora* is a serious threat

to native species of the Brazilian caatinga vegetation. **Scienc of the total environ**, v.482, n.1, p.108-113, 2014.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S. J.; SUGANTHI, P. In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of south Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. **Asi Pacif Jourof trop disease**, v.13, n.1, p.180-183, 2012.

SANTOS, APA.; PACHECO, SGA.; TELES CBG. Efeito leishmanicida *in vitro* do látex de *Cronton lechleri* (Euphorbiaceae). **Rev de Ciên Farmac Bás e Aplic**, v.36, n.3, p.413-418, 2015.

SANTOS KKA, ROLÓN M, VEJA C, ARIAS AR, COSTA JGM, COUTINHO HDM. Atividade leishmanciida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e momordicacharantia. **Rev de Ciên Farmac Bás e Aplic**, v.34, n.1, p.47-50, 2013.

SHACHI-SINGH, S.; VERMA, SK. Antibacterial properties of alkaloid rich fractioons obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. **Intern Jour of Phar Scien and Resear**, v.2, n.3, p.114-120, 2011.

SUKIRTHA, K.; GROWTHER, L. Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of sected medicinal plants. **J Nat Prod Plant Resour.**, v. 2, n. 6, p. 644-648, 2012.

WILSON ME, PEARSON RD. **Immunology of leishmaniasis**. In: Wyler DJ (Ed). *Modern parasite biology: cellular, immunological aspects*. New York: WH Freeman, 1990. p. 200-221.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Parasitologia da UPE, campus Santo Amaro, Recife-PE.

A Uninassau Caruaru.