

BIOPROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES ATIVOS CONTRA *Leishmania major* DE *Azadirachta indica* (A. JUSS)

Alessian Peterson Lopes de Sousa (ICV/UFPI), Sabrina Maria P. Carneiro (Colaboradora, RENORBIO-UFPI), Fernando Aécio de A. Carvalho (Co-orientador, Depto de Bioquímica e Farmacologia), Mariana Helena Chaves (Orientadora, Depto. de Química)

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 88 países, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas (BRASIL, 2007). Dentre as espécies que causam a leishmaniose tegumentar, a *Leishmania major* - alvo deste estudo - é conhecida por ocorrer nos países pertencentes ao Velho Mundo. Contudo, esta espécie é similar à *Leishmania braziliensis*, a qual é mais recorrente no Brasil (NEVES, 2005). O tratamento da LT é feito com antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina, que são de uso parenteral, requerem acompanhamento médico e são tóxicos, o que dificulta a adesão ao tratamento (BRASIL, 2005). A seleção de plantas com essa ação leishmanicida tem na medicina popular uma boa fonte de informação para pesquisadores na procura de substâncias potencialmente bioativas para o tratamento das leishmanioses. *Azadirachta indica* (A. Juss), pertencente à família Meliaceae, conhecida popularmente como nim, tem sido usada por séculos no Oriente como planta medicinal (no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre), repelente, praguicida, etc. Devido à baixa toxicidade e larga distribuição na natureza, o nim pode ser considerado como uma valiosa fonte para uso na Medicina tradicional e no desenvolvimento de drogas modernas. (MOSSINI, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de promastigotas de *Leishmania major* frente aos extratos EtOH e frações de partições de *A. indica*.

METODOLOGIA

As folhas e o tegumento da semente de *A. indica* foram coletadas em janeiro de 2009 no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFPI, Teresina-PI. O material vegetal foi seco ao ar (período de 30 dias), moídos e extraídos por maceração dez vezes com álcool etílico à temperatura ambiente. O solvente foi removido, os extratos liofilizados, pesados e submetidos a partição com os solventes: hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt), fornecendo as frações: hexânica, DCM, AcOEt e aquosa. A fração diclorometânica do extrato EtOH das folhas foi fracionada em coluna filtrante de gel de sílica resultando em quatro frações: hexânica-c, clorofórmica-c, AcOEt-c e MeOH-c

Foram utilizados cepas da espécie *L. major* (MHOM/1L/Friendlin), que tiveram sucessivas passagens em camundongos (Balb/C) e após respectivo isolamento, foram cultivadas em meios de Schneider's acrescido de 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. As formas promastigotas em sua fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços para cultivo celular, na quantidade de 1×10^6 leishmanias por poço. Em seguida, as frações obtidas de *A. indica* foram adicionadas aos poços, utilizando as concentrações de 100 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a temperatura de 26 °C e observadas por 24, 48 e 72 horas para o acompanhamento do respectivo crescimento e da viabilidade das leishmanias, sendo que, após cada intervalo, as leishmanias foram contadas em câmara de Neubauer. A avaliação da atividade foi

realizada mediante cálculo da concentração inibitória média (IC₅₀) de cada teste através da análise de probitos, usando o programa SPSS 13.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação da sensibilidade de promastigotas de *Leishmania major* frente aos extratos EtOH e frações de *A. indica* estão apresentados na Tabela 1, quantificados por meio da concentração inibitória média (IC₅₀). Quanto menor este parâmetro maior é a ação antileishmaniana. O extrato EtOH do tegumento foi mais ativo que o extrato das folhas, pois apresentou IC₅₀ menor.

Os valores de IC₅₀ descritos por Carneiro et al. (2008), com a *Leishmania amazonensis* após 24, 48 e 72h foram respectivamente 44,00; 37,18 e 38,00 µg/mL (folhas) e 5,82; 2,40 e 2,74 µg/mL (tegumento), mostrando um perfil um pouco diferente dos resultados obtidos com a *L. major*.

Dentre as frações de partição de ambos os extratos EtOH, a fração DCM é mais ativa do que a hexânica. A fração AcOEt é pouco ativa e não foi observado ação antileishmaniana para a fração aquosa.

Somente as subfrações clorofórmica (F. CHCl₃-c) e acetato de etila (F. AcOEt-c), resultantes do fracionamento da fração DCM da partição do extrato EtOH das folhas apresentaram inibição da cultura de *L. major*, destacando-se a primeira por apresentar a menor IC₅₀ no intervalo de 48h, conforme Tabela 1. Valores de IC₅₀ ainda menores foram observados por Carneiro et al. (2008) em *L. amazonensis*, para essas frações, sendo 1,24; 1,10 e 1,24 µg/mL para F. CHCl₃-c e 1,39; 1,98 e 1,43 µg/mL para F. AcOEt-c.

Khalid et al. (2005) relataram que o extrato metanol-água (80:20) do nim apresentou em média 44,04% de inibição, quando testado nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL, após 72 horas em formas promastigotas de *L. major*, contudo não determinou a IC₅₀.

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade de promastigotas de *Leishmania major* por meio da Concentração Inibitória Média (IC₅₀) e Intervalo de Confiança a 95%

EXTRATO/FRAÇÕES	IC ₅₀ em µg/mL			Intervalo de Confiança a 95%	
	24h	48h	72h	Inferior	Superior
EtOH (folha)	50,69	15,15	22,26	9,91	96,44
EtOH (tegumento)	2,04	3,70	7,60	1,31	10,13
F. Hexânica (folha)	24,70	23,33	20,86	10,35	42,70
F. DCM (folha)	2,96	2,18	2,61	1,67	3,98
F. AcOEt (folha)	98,73	47,59	94,15	32,22	148,37
F. Hexânica (tegumento)	36,60	11,47	9,92	7,48	54,46
F. DCM (tegumento)	1,96	1,99	2,39	1,06	3,11
F. CHCl ₃ -c	2,94	1,51	1,66	0,45	6,96
F. AcOEt-c	9,64	5,46	2,35	1,68	13,92

Os resultados dos cromatogramas obtidos em análise por CCD sugerem a presença de substâncias da classe dos terpenóides, evidenciadas pelas manchas de coloração rosa, sobretudo na fração hexânica. A fração diclorometânica do extrato EtOH da casca da semente mostrou-se bem diferente da fração diclorometânica do extrato EtOH das folhas, com a ocorrência de manchas amarelas, além das de coloração rosa características de terpenóides. Elas podem ser decorrentes da presença de limonóides, classe de substâncias de origem terpênica. Face ao exposto, os resultados sugerem que a(s) substância(s) ativa(s) devem ser de origem terpênicas.

CONCLUSÃO

O nim, *Azadirachta indica* (A. Juss), apresentou atividade antileishmania. A realização da partição dos extratos levou à obtenção de frações com boa atividade frente à *Leishmania major*. A fração DCM do extrato etanólico das folhas foi mais sensível para a *L. major* do que para a cepa de *L. amazonensis*. As frações DCM do extrato etanólico das folhas e do tegumento e as subfrações clorofórmica e acetato de etila derivadas de coluna filtrante desta primeira fração, destacaram-se por apresentarem efeito leishmanicida com pequenas concentrações inibitórias no decorrer de 72 horas.

Mediante os resultados observados é válido sugerir que as substâncias ativas contra leishmania, são de origem terpênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias:** guia de bolso. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 320 p.: il. (Serie B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.: il. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

CARNEIRO, S. M. P.; SANTOS, S. E. M.; VIANA, V. S. L.; CARVALHO, F. A. A.; CARVALHO, A. A.; SOUSA, C. M. M.; SANTANA L. C. L. R.; MOITA NETO, J. M.; CHAVES, Mariana Helena. Avaliação da sensibilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* aos extratos de *Azadirachta indica*, *Protium heptaphyllum* e *Platonia insignis*. In: III Encontro de Pós-Graduação da UFPI do III Congresso de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2008. **Caderno de Resumos.** Teresina - PI, 2008.

KHALID, F. A.; ABDALLA, N. M.; MOHAMED, H. E. O.; TOUM, A. M. ; MAGZOUN, M. M. A.; ALI, M. S. In vitro Assessment of Anti – Cutaneous Leishmaniasis Activity of Some Sudanese Plants. **Turkish Society for Parasitology**, v.29, n.1, p.3-6, 2005.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.1, p.139-148, 2005.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 11.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Palavras-Chave: *Leishmania major*. *Azadirachta indica*. Plantas Medicinais.