

Efeito dos extratos aquosos de folhas e mesocarpo externo de *Caryocar brasiliensis* camb. sobre o progresso de lesões incitadas por *Leishmania amazonensis*

Effect of aqueous extracts of leaves and outer mesocarp of *Caryocar brasiliensis* camb. on the progress of lesions incited by *Leishmania amazonensis*.

Léia Cardoso¹, Waldemar de Paula Júnior², Ronald Rafael Moreira Santos³

Resumo: Objetivo: A Leishmaniose cutânea é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotômíneos. O presente estudo objetivou avaliar a influência de extratos aquosos do mesocarpo externo e folha do *Caryocar brasiliensis* no progresso da infecção por *Leishmania amazonensis*. **Metodologia:** Trata-se de estudo experimental, com seis grupos de camundongos, dos quais três foram infectados na pata e os restantes na orelha. Dois grupos de cada sítio de infecção receberam intraperitonealmente, doses de 100 µl de extratos aquosos, do mesocarpo externo e folhas, respectivamente, sendo os restantes grupos controles. As lesões foram monitoradas a partir do seu surgimento. **Resultados:** Os resultados revelaram atividade dos extratos no progresso da infecção, com lesões menores observadas nos camundongos infectados na pata e retardo no aparecimento das lesões nos camundongos infectados na orelha. **Conclusão:** Os resultados apontam a importância dessa planta, mas, ainda, não está claro o papel desses extratos no progresso da infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Caryocar brasiliensis*. Extratos vegetais. Terapia alternativa.

Abstract: Objective: Cutaneous leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted to humans by sting of sandflies. The present study evaluated the influence of aqueous extracts of the outer mesocarp and leaf *Caryocar brasiliensis* in the progress of the infection with *Leishmania amazonensis*. **Methods:** This is an experimental study with six groups of mice, three of whom were infected in the foot and the other in the ear. Two groups of each infection site were injected intraperitoneally at doses of 100 µl of aqueous extracts of the epicarp and leaves, respectively, the remaining control groups. Lesions were monitored from its inception. **Results:** The results showed activity of the extracts in the progress of infection, with lesions observed in mice infected paw and delayed appearance of lesions in mice infected ear. **Conclusion:** The results indicate the importance of this plant but is not yet clear what role these extracts in the progress of infection.

Keywords: Leishmaniasis. *Caryocar brasiliensis*. Vegetable extracts. Alternative therapy.

1 Especialista em Ciências da Saúde.

2 Mestre em Ciências Farmaceuticas pela Universidade Federal do Paraná.

3 Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença não contagiosa, de curso lento e evolução crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania donovani*, que afeta principalmente a pele, cartilagens nasofaríngeas, podendo, eventualmente, afetar mucosas, de forma localizada ou difusa¹⁻³. É uma infecção zoonótica, que atinge o homem, de forma secundária, pela picada da fêmea infectada de diferentes espécies de mosquitos da família Phlebotominae, do gênero *Lutzomia* ou *Psychodopygus*^{3,4}. Caracteriza-se por uma diversidade de manifestações clínicas, devido à interação parasito-hospedeiro^{1,2}. A manifestação da infecção no homem é muito variável. Há ocorrência de lesões ulcerativas no ponto de inoculação, que podem ou não ser doloridas, exibindo crescimento excêntrico, exudato mucopurulento, bordos elevados e emoldurando, com fundo intensamente avermelhado e granulomatoso^{1,2,5}.

As lesões podem ser únicas ou difusas, podendo cicatrizar-se espontaneamente, em curto período, ou evoluírem para estado crônico. Algumas espécies de *Leishmania*, especialmente no Novo Mundo, induzem a formação de lesões mucocutâneas tardias, mesmo após anos de cura da lesão primária, atingindo tecidos nasofaríngeos, caracterizando-se por destruição tissular progressiva, ainda que com poucos parasitos presentes, podendo ser fatais. Embora a causa dessa variação não tenha sido totalmente elucidada, é reconhecida a importância de fatores como espécie do parasito, características genéticas e resposta imune do hospedeiro⁶.

A doença é considerada um grave problema de saúde pública, com ampla distribuição mundial,

e, no Continente Americano, não é registrado casos apenas no Chile e Uruguai. São estimados 350 milhões de pessoas expostas e registrados um número aproximado de dois milhões de novos casos a cada ano⁴.

No Brasil, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios das unidades federais (UF) e análises epidemiológicas sugerem padrões distintos de transmissão, resultantes da diversidade de agentes etiológicos, hospedeiros, reservatórios e vetores, o que dificulta o seu controle^{3,4}.

Em função de sua magnitude e do risco de deformidades que pode produzir no ser humano, bem como pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, é uma das afecções dermatológicas que mais merece atenção⁴.

O tratamento da LTA é feito com uso de medicamentos específicos, os antimoniais pentavalentes, sendo utilizado no Brasil o antimoniatado de N-metil glucamina (Glucantime[®]), num esquema de 15 mg/Sb+5/Kg/dia, por um período de 20 dias. Em caso de ineficácia ou contra indicação ao medicamento, podem ser usados a Anfotericina B e o isocianato de pentamidina. Em todos os casos, é recomendado, ainda, repouso e boa alimentação^{4,6}. Estes medicamentos podem suscitar vários efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, cefaléias, distúrbios gastrointestinais, alterações eletrocardiográficas, renais, hepáticas, pancreáticas, erupção cutânea, distúrbios sanguíneos, entre outros⁶.

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. O planeta possui cerca de 250-500 mil espécies de plantas, sendo que apenas 5% têm sido estudada fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor

tem sido avaliada sob os aspectos biológicos.

Caryocar brasiliensis Camb. é uma espécie amplamente distribuída no cerrado e provavelmente, exclusiva deste tipo de vegetação⁷. A planta possui muitas aplicações, inclusive na medicina. Recentemente, foi observada atividade lectínica nos extratos de várias partes do fruto do *Caryocar brasiliensis* Camb, a qual apresentou toxicidade para formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, alterando sua morfologia estrutural e ultra-estrutural, interferindo nos processos de adesão e invasão do protozoário na célula hospedeira⁸.

A avaliação fitoquímica das folhas do *C. brasiliensis*, realizada por Lopes *et al*⁹ demonstrou a presença de saponinas, taninos, esteróides, flavonóides, cumarinas e resinas. Neste trabalho, foi ainda, comprovada atividade biológica contra a espécie *Biomphalaria glabrata*, evidenciando a presença de metabólitos secundários importantes e potencial para que a planta seja empregada como agente moluscicida.

O extrato bruto etanólico das folhas de *C. brasiliensis* mostrou-se com atividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* Var. *neoformans*, inibindo 89,5% dos isolados numa concentração menor ou igual a 1000 ug/ml. A cera epicuticular das folhas do pequizeiro também apresentou atividade biológica, com diferenças sazonais, sendo a cera obtida das folhas no período seco, mais eficientes. Todos os isolados foram inibidos com os óleos essenciais, os quais apresentaram elevada ação antifúngica, devido à sua fração acetato de etila¹⁰.

O extrato etanólico da casca de *C. brasiliensis* foi testado sobre a parasitemia do *Trypanosoma cruzi*, demonstrando significativa interferência sobre a curva de parasitemia, reduzindo o número de parasitos no sangue¹¹.

Assim, o presente estudo objetivou verificar a influência dos extratos aquosos de folhas e

mesocarpo externo do *Caryocar brasiliensis* Camb. no progresso da lesão causada pela infecção de *Leishmania amazonensis* em camundongos albinos da linhagem EPM-1. Além disso, fornecer embasamento científico e colaborar para novas investigações que possam subsidiar um tratamento alternativo para as populações com dificuldades de acesso ao tratamento alopático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem EPM-1 albinos heterogênicos convencionais, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 170 a 200 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação natural e temperatura ambiente. A dieta foi constituída por ração própria para a espécie e água à vontade. Geralmente, os valores fisiológicos dos animais de experimentação são constantes para uma mesma linhagem e podem sofrer variações influenciadas pela dieta, ambiente, manuseio, entre outros fatores¹². Portanto, procurou-se manter as condições normais do ambiente, para que não fossem alteradas as condições fisiológicas dos animais.

Parasitas e Antígenos

Os camundongos foram infectados com cepas PH8 de *Leishmania amazonensis*, fornecidas pelo laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), obtidas em fase estacionária de formas promastigotas em meio Grace, pH 6,3, por 5 dias a 27 °C, enriquecido com 20% SBF, 1 ml de L-Glutamina 200 mM, 0,5ml of penicilina/estreptomicina (solução contendo 2000U/ml/2mg/ml). Os antígenos leishmaniais foram obtidos de promastigotas em fase estacionária lavados 4 vezes com PBS (Tampão Salino de Fosfato), a solução

ajustada para uma concentração de 10^6 organismos/ml de meio.

Extratos

Após a coleta dos frutos e folhas, estas foram secas a temperatura ambiente. Posteriormente, as folhas foram trituradas e armazenadas em frascos de vidro. Foi utilizada quantidade de material vegetal para 100 ml de extrato aquoso. Os extratos foram preparados, periodicamente, seguindo metodologia descrita por Borges *et al* (1994)¹³, adaptada de Coutinho e Hashimoto (1971)¹⁴.

Infecção

Infecção na Orelha

A fim de avaliar o curso da infecção, foram inoculados 10^6 promastigotas/10 μ l de meio, na orelha direita, subcutânea, de cada camundongo do grupo experimental e controle (5 animais/grupo). Os grupos foram distribuídos com base no tratamento: Grupo I – Administração de extrato aquoso do mesocarpo externo de *Caryocar brasiliensis* Camb. Grupo II – Administração de extrato aquoso da folha de *Caryocar brasiliensis* Camb. Grupo III – Administração de dieta padrão, sem extratos (controle)

Após o aparecimento das lesões, o volume das mesmas foram medidos, periodicamente, durante 5 semanas.

Infecção na pata

O curso da infecção na pata, também, foi avaliado. Três grupos, cada um com 5 camundongos, foram infectados na pata direita, com uma dose de 10^6 promastigotas/20 μ l de meio. A distribuição de cada grupo foi dada, de acordo com o tipo de

tratamento:

Grupo I – Administração de extrato aquoso do mesocarpo externo de *Caryocar brasiliensis* Camb.

Grupo II – Administração de extrato aquoso da folha de *Caryocar brasiliensis* Camb.

Grupo III – Administração de dieta padrão, sem extratos (controle).

O tamanho da lesão foi medido, periodicamente, durante 10 semanas. Foram administrados 100 μ l/animal de extratos de cada grupo, em dias alternados, pela via intraperitoneal, em ambas as formas de infecção, durante todo o tempo do estudo.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados por meio de um programa de planilha eletrônica, *Microsoft Excel* (versão 2003). Através do Software estatístico R (versão 2.10.3), foram feitas regressões, utilizando modelos lineares generalizados assumindo distribuição normal para os dados de tamanho da lesão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando os resultados entre os camundongos infectados na pata, o tratamento com extratos aquosos do mesocarpo externo e da folha do *c. brasiliensis*, não foi observada diferença significativa no tamanho da lesão, sendo similares para os grupos teste e controle (Fig. 1).

Em contraste, quando comparados os grupos infectados na orelha, verificou-se retardo no aparecimento da lesão nos grupos tratados em relação ao grupo controle. O tratamento com extrato aquoso da folha apresentou diferença significativa

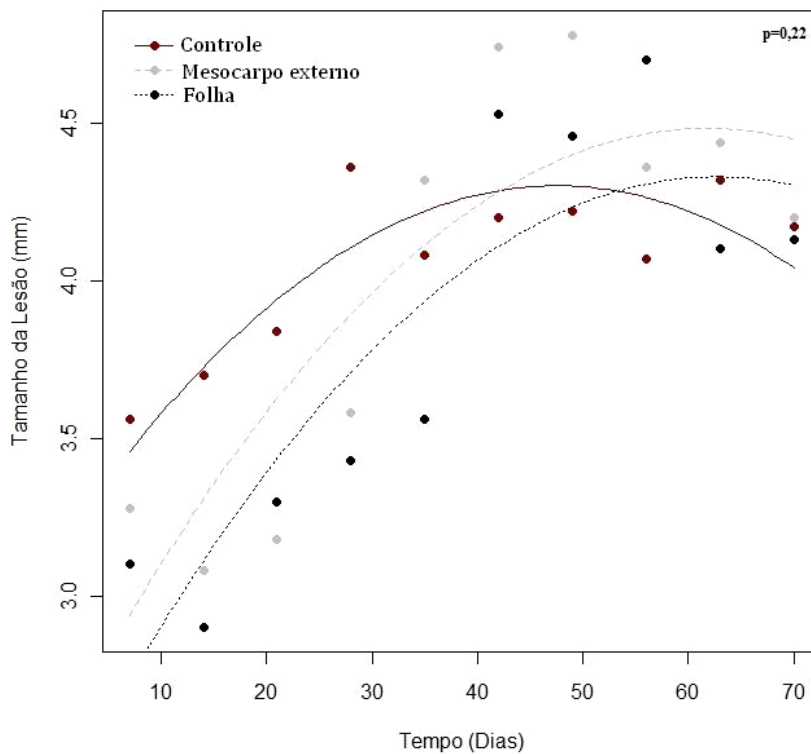


Figura 1 Influência dos extratos aquosos do mesocarpo externo e folhas de Caryocar brasiliense Camb. no progresso da infecção por *L. amazonensis* em camundongos EPM-1, infectados na pata.

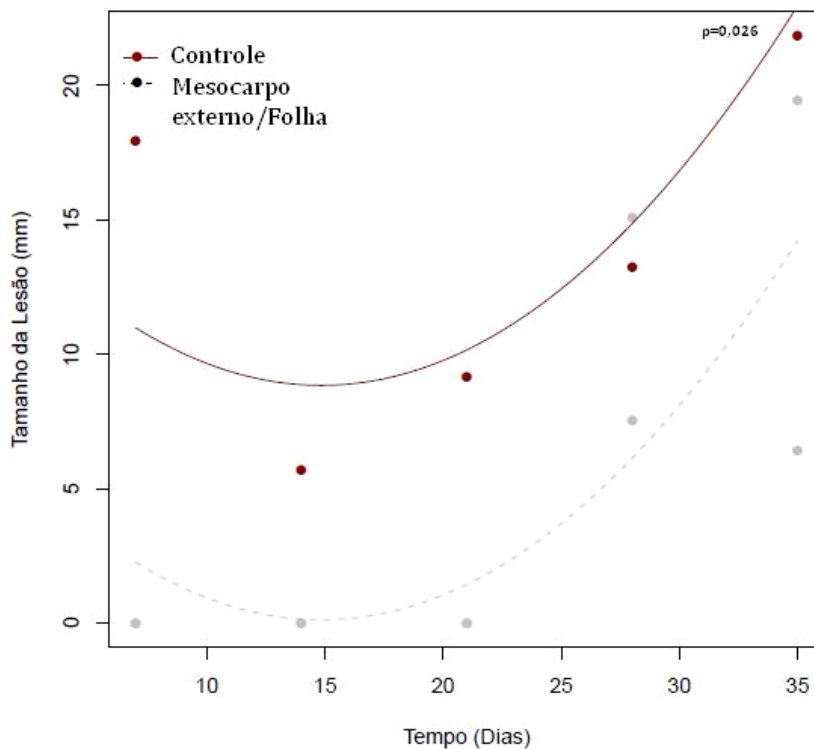


Figura 2 Influência dos extratos aquosos do mesocarpo externo e folhas de Caryocar brasiliense Camb. no progresso da infecção por *L. amazonensis* em camundongos EPM-1, infectados na orelha.

($p=0,026$) no progresso da lesão (Fig. 2).

O sítio de infecção pode ter influenciado o desenvolvimento da lesão e as diferenças no progresso das lesões podem estar relacionadas à disponibilidade celular nos diferentes órgãos. As leishmanias, independente da espécie, vivem e proliferam em macrófagos e monócitos, no chamado Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM)¹⁵. Considerando que na orelha predomina tecido cartilaginoso, os macrófagos e monócitos estão presentes apenas no tecido conjuntivo periférico a este, o que poderia explicar a diferença no tempo de desenvolvimento e progresso da lesão. Ademais, espécies distintas de leishmania têm preferência por diferentes órgãos, determinando lesões maiores ou menores¹⁶. Os dois fatores mencionados podem ser os responsáveis pelas diferenças observadas, constituindo formas clínicas distintas da doença no mesmo organismo.

Alterações qualitativas/quantitativas de metabólitos encontrados nos extratos de uma planta podem estar relacionadas aos fatores extrínsecos que influenciam o seu crescimento e desenvolvimento⁹, bem como o solvente utilizado, que pode extrair determinados compostos em maior ou menor quantidade. Assim, as diferenças encontradas em nosso estudo, podem estar relacionadas aos constituintes secundários, presentes nas diversas partes da planta uma vez que foram obtidos com o mesmo solvente.

Os extratos das partes do pequizeiro, utilizadas neste estudo, apresentam importantes classes de metabólitos secundários como flavonóides, óleos essenciais, saponinas e taninos condensados e hidrolisáveis¹⁷, cumarinas e resinas⁹ que podem estar relacionados à sua maior eficiência no controle da infecção. A ação de terpenóides e saponinas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*^{18,19} e sobre formas amastigotas de

*L. donovani*²⁰ foi relatada e é possível que essas substâncias, presentes nas folhas e no mesocarpo externo dessa planta, possam contribuir para o controle da infecção por esses parasitas e carecem de estudos mais detalhados neste sentido.

Atividade do extrato etanólico das folhas do pequizeiro sobre o desenvolvimento *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada por Paula Júnior¹⁷ e os seus resultados indicaram intensa atividade contra esse parasita, interferindo na viabilidade e/ou morfologia das leishmanias, na concentração de 5mg/ml, sugerindo que o efeito é dependente da dose e do tempo de exposição.

As formas infectantes das leishmanias, como mencionado, atuam dentro de células, o que pode ter dificultado a ação dos metabólitos da planta no progresso da infecção.

Entretanto, proteínas de diferentes partes do fruto e de sementes foram isoladas e foi descrita atividade hemaglutinante, sugerindo que parte da fração protéica constitui-se de lecitinas⁸, as quais fazem parte do sistema imunológico e atuam com o objetivo de impedir a instalação da infecção²¹. Além disso, o preparo de folhas demonstrou tendência dose-dependente em interferir positivamente na proliferação de linfócitos²². Contudo, maiores estudos são necessários para mostrar a ação desses extratos e seus componentes no progresso da infecção.

Outros extratos do *C. brasiliense*, extraídos com diferentes solventes, demonstraram atividades antifúngicas, antiparasitárias e moluscicida, o que indica a sua importância no controle de doenças.

Importante ressaltar que, por tal estudo ter sido realizado *in vivo*, vários fatores podem interferir na ação do composto, além de não ter sido controlada a dosagem dos metabólitos presentes nos extratos utilizados. Constitui este, portanto, um estudo preliminar em que muitas questões surgem

como a dose mínima ideal e/ou o princípio ativo no controle desta parasitemia e exigem estudos mais detalhados para determinar a importância dessa planta no controle ou progresso da infecção por leishmanias.

A resistência ou suscetibilidade da linhagem de camundongos utilizada neste estudo não é reconhecida por outros autores.

O papel dessa planta no controle de infecção por *Leishmania*, ainda, não está claro. E, uma vez demonstrada a relação entre *C. brasiliensis* e o controle da enfermidade, são necessários mais estudos na tentativa de elucidar qual metabólito, dentre os vários existentes na espécie, é determinante para tal efeito.

REFERÊNCIAS

1. BARBOSA, W.; BARBOSA, G. L. Leishmaniose cutâneo-mucosa. In: CASTRO, L.P; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.M. *Protozooses humanas*. São Paulo, Fundação BIK. 18-90, 1994.
2. OLIVEIRA, M.R. de *et al.* Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in swiss mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. São Paulo, v.41, n.2, p.87-94, 1999.
3. CURTI, M.C.M. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. *Rev. de Ciên. Farm. Básica e Apl*, v.30, n.1, p. 63-68, 2009. Disponível em: <http://200.145.71.150/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/901/760> Acesso em: 07 Apr. 2012.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acesso em: 07 Apr. 2012.
5. TOLEDO, V. *et al.* Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Ummunological Aspects before and after Treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.96, p.89-98, 2001.
6. NAME, R.Q. *et al.* Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.80, p.249-254, 2005.
7. CHÉVEZ POZO, O.V.C. *O pequi (Caryocar brasiliense): Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais*. 1997. Dissertação (Mestrado em Administração Rural) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
8. SANTIAGO, F.M. *Estudo das propriedades lectínicas, tóxicas e hemolíticas do fruto de Caryocar brasiliensis*. 1999. Monografia (graduação em ciências biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
9. LOPES, T.C. *et al.* Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. *Cad. Pesq.*, v.18, n.3, p.23-30, 2011. Disponível em: <<http://www.periodicos eletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/viewFile/641/393>>. Acesso em: 08 Mai. 2008.
10. PASSOS, X.S. *et al.* Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.35, n.6, p.623-627, 2002.

11. HERZOG-SOARES, J. D'Arc *et al.* Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(suppl 1), 1/2, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300001>>. Acesso em: 08 Mar. 2012.
12. SANTOS, M.R.V. *et al.* Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, v.6, n.10, p.1-6, 2010. Disponível em: <<http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/viewFile/144/63>> Acesso em 08 Mar. 2012.
13. BORGES, E.E.L.; SILVA, G.F.; LOPES, E.S. Avaliação de substâncias alelopáticas em vegetação de uma floresta secundária. 2-arbustos. *Revista árvore*, v.18, n.3, p.275-286, 1994.
14. COUTINHO, L.M.; HASHIMOTO, F. Sobre o efeito inibitório da germinação de sementes produzido por folhas de *Calea cuneifolia* DC. *Ciência e cultura*, v.23, n.6, p.759-764, 1971.
15. CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 55, n. 1, 2003. Available from: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100023&lng=en&nrm=iso>. Access on: 08 Mar. 2012.
16. SARTORI, A.; OLIVEIRA, M.A.P.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *The Journal of Immunology*. v.159,p.2849-2857, 1997.
17. PAULA-JÚNIOR, W. *Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de Caryocar brasiliense Cambess.* 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
18. IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, v.10, n.2, p.65-68, 1994.
19. CARVALHO, P.B. de; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, v.72, n.6, p.599-618, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X0100301X>> Acesso em: em 10 Mar.2012.
20. MAES, L. *et al.* In vitro and In vivo activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from de plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.1, p.130-136, 2004. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/48/1/130.full.pdf+html>> Acesso em: 10 Mar. 2012.
21. LIMA-FILHO, A.B. *et al.* Avaliação do complemento na doença meningocócica. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, v.34, n.1, p.3-6, 2011. Disponível em: <http://www.asbai.org.br/revistas/vol34/avaliacao_34_1.pdf> Acesso em: 08 Mar.2012.
22. MACHADO-JÚNIOR, J.C. *Estudo in vitro do potencial imunomodulatório de plantas medicinais por citometria de fluxo.* 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)