**Estudo da atividade tripanosomicida dos extratos hexânico, diclorometânico e**

**metanólico das sementes de *Lonchocarpus cultratus***

Patricia Karoline Matos (PIBIC/Fundação Araucária/Unioeste), Aline Griebler, Rafael Andrade Menolli, Lívia Godinho Temponi, Tereza Cristina Marinho Jorge (Orientador), e-mail: pati.k.matos@hotmail.com

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas/Cascavel, PR.

Ciências da Saúde, Farmacognosia

**Palavras-chave:** Anti-*Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, Imbira.

**Resumo**

A tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo, sendo endêmica nos países da América Latina e considerada uma doença negligenciada, o que torna essa doença um sério problema de saúde pública. A pesquisa por novas drogas anti-*T. cruzi* é muito importante, pois existem somente duas drogas para tratamento e ambas apresentam eficácia limitada na fase crônica da doença, além de produzirem efeitos colaterais intensos. Considerando a biodiversidade de espécies vegetais brasileiras como fonte de desenvolvimento de novos fármacos e a presença de flavonoides com atividade antiprotozoária no gênero *Lonchocarpus*, o presente trabalho tem como objetivo estudar a atividade anti-*T. cruzi* dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico de *Lonchocarpus cultratus*. Os extratos hexânico (LHS), diclorometânico (LDS) e metanólico (LMS) foram obtidos através de macerações exaustivas e sucessivas em hexano, diclorometano e metanol. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas frente a diferentes concentrações dos extratos, de controle positivo (benznidazol), controle branco e controle negativo (dimetil-sulfóxido) para avaliar a atividade anti-*T. cruzi*. Valores de CI50 mostraram que o extrato LHS foi ativo, LDS muito ativo e LMS inativo

**Introdução**

A tripanosomíase americana ou Doença de Chagas foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que descreveu em curto espaço de tempo, o agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, seu desenvolvimento em insetos vetores, assim como os respectivos reservatórios silvestres, aspectos epidemiológicos da doença e suas características clínicas (Chagas, 1909).

Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o protozoário causador da Doença de Chagas, sendo endêmica nos países da América Latina. Esta é uma doença negligenciada e considerada um problema de saúde pública (DNDI, 2016, WHO, 2016)

Os vetores transmissores, conhecidos como bicho barbeiro, podem ser de várias espécies e gêneros, como por exemplo, os triatomíneos: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* e as espécies de *Rhodinius masutus* e *R. prolixus*. Entretanto, a transmissão pode ocorrer por transfusão sanguínea, ingestão de alimentos contaminados pelo agente, de forma congênita e por acidentes de laboratório (Rassi Jr *et al.*, 2012).

O tratamento desta doença é complicado, pois existem apenas duas drogas disponíveis para tratar a doença: benznidazol e nifurtimox, sendo que, no Brasil, a comercialização de nifurtimox está suspensa desde 1980. Ambos os medicamentos apresentam eficácia limitada na fase crônica da doença, além de efeitos colaterais intensos (Rassi Jr. *et al.*, 2012).

O gênero *Lonchocarpus* da família Fabaceae se caracteriza por apresentar metabólitos secundários bioativos como por exemplo, flavonóides do tipo chalconas. Um levantamento bibliográfico sobre a planta *Lonchocarpus cultratus*, conhecida popularmente com Imbira ou Feijão-cru,mostrou que existem poucos estudos sobre esta espécie vegetal*,* entretanto há registros de atividade antineoplásica e antimicrobiana relacionadas a chalconas isoladas desta espécie (Mello *et al.*,1974; Pires *et al.*, 2011).

Considerando a biodiversidade da flora brasileira como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos, o presente trabalho possui o objetivo de investigar atividade anti-*T. cruzi* dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das sementes de *L. cultratus*

**Material e Métodos**

Foram colhidos 335,484 g de sementes de *L. cultratus* que foram secas em estufa de ar circulante, passado pelo moinho de facas e obteve-se 313,265 g de extrato seco das sementes. Esses foram submetidos à maceração sucessiva em hexano, CH2Cl2 e MeOH, resultando nos extratos hexânico, denominado LSH (95,940 g), diclorometânico, LDS (8,174 g) e por fim, o extrato metanólico LMS (16,450 g). Também foram coletados uma quantidade de galhos e folhas para a confecção da exsicata, depositada no Herbáreo da Unioeste (UNOP n°20).

Os bioensaios de atividade anti-*T. cruzi* foram realizados em triplicatas, com formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% do soro fetal bovino frente a diferentes concentrações dos extratos LHS, LDS e LMS (1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg.mL-1). No bioensaio também foram usados o controle branco (*T. cruzi* e meio de cultura), controle positivo (*T. cruzi*, meio de cultura e o solvente utilizado dimetil-sulfóxido - DMSO) e controle positivo (*T. cruzi*, meio de cultura e benznidazol nas mesmas concentrações dos extratos). A atividade tripanosomicida foi verificada após 72 horas em estufa à 28°C, através de contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer. O parâmetro empregado na avaliação dos testes tripanosomicidas foi a concentração inibitória 50% (CI50), isto é, a concentração do extrato vegetal capaz de inibir 50% do crescimento do protozoário, após 72 horas de tratamento. O valor da CI50 foi obtido a partir dos percentuais da taxa de crescimento (TC %) e os percentuais de inibição do crescimento dos protozoários contra cada de um dos extratos, que foi dado por:



onde:

MC = média de crescimento de *T. cruzi* em cada controle e nas culturas com diversas concentrações de benznidazol e de cada um dos 3 extratos.

MCB = a média de crescimento no controle branco.

O percentual de inibição do crescimento dos protozoários (CI %) foi dado por:



onde:

TC% = é o percentual da taxa de crescimento.

**Resultados e Discussão**

Através da média de crescimento dos parasitas, pode-se calcular o percentual da taxa de crescimento de *T. cruzi* (TC%) frente às diferentes concentrações de cada um dos extratos e do controle positivo (BZN). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1**. Taxas do crescimento de *T. cruzi* (TC%) frente a diversas concentrações de LHS, LDS, LMS e dos controles BZN, CN e CB.

|  |  |
| --- | --- |
| **Concentrações****(µg.mL-1)** | **TC%** |
| **Extratos das sementes de *L. cultratus*** |
| **LHS** | **LDS** | **LMS** |
| 1 | 79,33 | 75,49 | 89,76 |
| 10 | 72,51 | 40,95 | 87,84 |
| 15 | 62,12 | 38,44 | 88,99 |
| 50 | 56,01 | 19,50 | 87,71 |
| 100 | 41,24 | 15,88 | 86,81 |
| 150 | 32,28 | 12,81 | 86,68 |
| 175 | 31,36 | 7,70 | 86,30 |
| CN (DMSO 2%) | 96,64 | 84,40 | 90,78 |
| CB | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

Obs.: LHS, LDS e LMS correspondem aos extratos da semente de *L. cultratus*; CN, controle negativo, CB, controle branco e BZN, controle positivo.

Os dados da Tabela 1 mostraram que TC% tende a diminuir, à medida que as concentrações dos extratos LDS e LHS e do controle BZN aumentam. Nota-se que os valores de TC% no CB se mantêm constantes (100%), enquanto que no CN há uma pequena diminuição (84,40% a 96,64%), mostrando que o solvente utilizado influencia o crescimento dos parasitas.

A atividade anti-*T. cruzi* foi estudada, através da obtenção de CI50, que é a concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento do protozoário. Os resultados de CI50 são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados de CI50 dos extratos hexânico (LHS), diclorometânico (LDS) e metanólico (LMS) das sementes de *L. cultratus* e controle positivo constituído por benznidazol (BZN).

|  |  |
| --- | --- |
| **Amostras** | **CI50 (µg. mL-1)** |
| LHS | 42,58 |
| LDS | 6,16 |
| LMS | >105 |
| BZN | 2,97 |

Obs.: LHS, LDS e LMS correspondem aos extratos da semente de *L. cultratus* e BZN, controle positivo.

[Osorio *et al*. (2007)](#_ENREF_26) classificaram os extratos vegetais quanto a atividade anti-*T. cruzi* em: muito ativos (CI50< 10 µg.mL-1), ativos (10 <CI50< 50 µg.mL-1), moderadamente ativos (50<CI50<100 µg.mL-1) e inativos (CI50> 100 µg.mL-1). Considerando esta classificação e observando-se os resultados da Tabela 2, pode-se concluir que o extrato LCH (CI50 42,58 µg.mL-1) é ativo, o extrato LDS (CI50 6,16 µg. mL-1) é muito ativo e o extrato LMS (CI50>105 µg.mL-1) inativo.

A presença de atividade anti-*T. cruzi* para esta espécie pode ser atribuída aos constituintes comuns das plantas deste mesmo gênero, pois de acordo com Magalhães *et al.* (1996) pode-se considerar as plantas do gênero *Lonchocarpus* com amplo potencial biológico, incluindo anti-*T. cruzi*, e isso tem sido atribuído aos diversos metabólitos isolados, como chalconas e flavonóides. Além disso, na pesquisa de Borges-Argáes *et al*. (2007), um constituinte (isocordoína) isolado do extrato das raízes de uma espécie do mesmo gênero, *Lonchocarpus xuul*, também apresenta atividade anti-tripanosômica. De *L. xuul* também foi isolada 4’,5 dimetoxi(6,7:2”,3”)-6”,6”-dimetilpiranoflavona que também apresentou inibição *in vitro* sobre o desenvolvimento do protozoário *T. cruzi* (Borges-Argaez *et al*., 2009).

**Conclusões**

Com este trabalho pode-se concluir que o extrato LCH é ativo, o extrato LDS é muito ativo e o extrato LMS inativo, sendo promissor a continuidade de estudos com os extratos LDS e LHS em relação à sua toxicidade e isolamento de seus constituintes.

**Agradecimentos**

À Fundação Araucária pela concessão de bolsa de iniciação científica.

**Referências**

# Borges-Argaez, R.; Balnbury, L.; Flowers, A.; Gimenez-Turba, A.; Ruiz, G.; Waterman, P. G., & Pena-Rodriguez, L. M. (2007). Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from Lonchocarpus spp. *Phytomedicine* 14, 530-533.

Borges-Argaez, R.; Vela-Catzin, T.; Yam-Puc, A.; Chan-Bacab, M.J.; Moo-Puc, R.E. & Caceres-Farfan, M. (2009) Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. *Planta Medica* **75**,1336-1338

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp*., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159-218.

DNDI, (2016). Doença de Chagas. Drugs for Neglected Diseases initiative. Dísponível em: < http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html >. Acesso em: 18 jun 2016.

Magalhães, A.F.; Azevedo Tozzi, A.M.G.; Noronha Sales, B.H.L. & Magalhães, E.G. (1996) Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens.* *Phytochemistry* **42,** 1459-1471

Mello, J.F.; *et al.* (1974). Chalcones with antineoplastic and antibiotic activities isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. *Revista do Instituto de Antibióticos* **14**, 39-50.

Osorio, E.; *et al*. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian *Annonaceae. Journal of Ethnopharmacology* **111**, 630-635.

Pires, A. M. L.; Silveira, E. R. & Pessoa, O. D. L. (2011) Flavonoides de *Lonchocarpus campestris* (Leguminosae). *Química Nova* **34** 268-271.

Rassi Jr., A.; Rassi, A., & Rezende, J. M. de (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America* **26**, 275-291.