

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Matricaria chamomilla* (L.) FRENTE AS FORMAS DE *Leishmania amazonensis*

Vitória Martins Prizão (PIBIC/CNPq), Thaysa Ksiaskiewicz Karam (PCF), Celso Vataru Nakamura (Orientador) (cvnakamura@gmail.com).

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas III – Microbiologia (21200009)

Palavras-chave: Leishmaniose, fitoterapia, camomila.

Resumo:

Existem diversas patologias tropicais negligenciadas que afetam a vida de bilhões de pessoas, acometendo especialmente territórios em desenvolvimento. Uma dessas doenças é a leishmaniose; sua alta taxa de prevalência está aliada a limitações nos tratamentos disponíveis (alta toxicidade, inseguro e de eficácia reduzida). Nesse contexto, a descoberta de novas substâncias que possuam um maior efeito contra essa zoonose e menos efeitos colaterais aos pacientes se faz necessário, e os produtos naturais são um dos alvos dessas pesquisas. Os capítulos florais da *Matricaria chamomilla* L., conhecida popularmente como camomila, vêm sendo utilizados desde tempos remotos, para diversas aplicações. Portanto, o objetivo desse trabalho foi produzir o extrato bruto, assim como frações da *M. chamomilla*, e avaliar suas atividades frente às formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*. Capítulos florais de *M. chamomilla* foram mantidos em etanol 95% por 12 dias e, posteriormente, liofilizados para a produção do extrato bruto; por meio de partição foram preparadas frações (hexânica; acetato de etila e hidrometanólica). O extrato bruto e as frações obtidas foram avaliadas frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e avaliada a citotoxicidade frente a linhagem de macrófagos J774A.1. Com os resultados obtidos, concluiu-se que a fração hexânica apresentou melhores resultados, e que mais experimentos são necessários para elucidar completamente a atividade dessa fração frente à *L. amazonensis*.

Introdução

As leishmanioses fazem parte de grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários, sendo que há mais de vinte espécies que podem ser patógenos humanos, os quais são responsáveis por milhares de mortes no mundo. Os protozoários causadores das leishmanioses são flagelados, do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae, sendo parasitos intracelulares obrigatórios (ESCH & PETERSEN, 2013; ORYAN et al., 2018). A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (ESCH & PETERSEN, 2013). Esses protozoários apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com hospedeiro intermediário (invertebrado) e definitivo (vertebrado) (SERENO et al, 2019).

O tratamento para as leishmanioses é escolhido conforme a localização, os sintomas do paciente e possíveis agentes etiológicos (JAFFARY et al., 2016). O tratamento mais utilizado é a quimioterapia, sendo os antimoniais pentavalentes o padrão para leishmaniose cutânea (ORYAN et al., 2018). Essas drogas podem ser limitadas pelo preço elevado, toxicidade, longo período de tratamento e necessidade de administração intravenosa (ORYAN et al., 2018; SERENO et al., 2019). Pelos diversos problemas existentes com os medicamentos disponíveis, há a necessidade de estudos de novos compostos com atividade anti-leishmania (ORYAN et al., 2018). Uma das alternativas são substâncias de origem natural; como a *Matricaria chamomilla* L, conhecida popularmente como camomila.

A *Matricaria* é um gênero de flores que se encontra na família Asteraceae, uma família de dicotiledôneas (SINGH et al., 2011). Há relatos na literatura afirmando que a *M. chamomilla* apresenta diversos efeitos benéficos para a saúde e por isso já foi amplamente utilizada na preparação de medicamentos da medicina tradicional e homeopática (SINGH et al., 2011). Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi realizar a produção do extrato bruto e de diferentes frações e investigar suas atividades frente as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*.

Materiais e métodos

Obtenção do extrato bruto e das frações de M. chamomilla

O extrato bruto foi preparado utilizando os capítulos florais dessecados. O material vegetal foi macerado com o líquido extrator (etanol 95%; 15 g:175 mL; total de 1000 g), por um período de 12 dias, na ausência de luz. Após essa etapa, foram realizadas a filtração, a rotaevaporação e a liofilização. Para o particionamento das frações foram utilizados 25 g de extrato bruto, o qual foi diluído em metanol e água (1:1) e submetido a partição sucessiva com solventes de polaridade crescente: hexano (5 L) e o acetato de etila (3 L). A fração residual foi denominada como hidrometanólica. Os solventes foram rotaevaporados à temperatura de 40° C, com posterior liofilização e acondicionamento das amostras.

Cultivo dos parasitos e dos macrófagos J774A. 1

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram mantidas em meio Warren (“Difco®”, hemina e ácido fólico), pH 7,0, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco Invitrogen, Gaithersburg, MD, EUA), à 25 °C. Macrófagos da linhagem J774A.1 foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB à 37 °C, com 5% de CO₂.

Avaliação da atividade frente as formas promastigotas de L. amazonensis

Promastigotas com 48 h de cultivo foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁶ protozoários/mL, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, em placas de 96 poços. As promastigotas foram tratadas com concentrações crescentes do extrato/frações de *M. chamomilla*, e incubadas por 72 h à 25 °C. Os controles foram realizados apenas o meio de cultura. Após o período de incubação, os protozoários foram fixados com formalina 3% e realizada a contagem das formas viáveis com o auxílio da câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle sem tratamento.

Avaliação da atividade frente as amastigotas intracelulares de L. amazonensis

Lamínulas de vidro redondas foram inseridas em placa de 24 poços, e sobre elas foram dispensados uma suspensão de células contendo macrófagos (5×10^5 céls/mL) e promastigotas (5×10^6 parasitos/mL), com 6 dias de cultivo, em meio RPMI 1640 e 10% de SFB, e incubados por 24 h à 34 °C e 5% de CO₂. Após, foi realizado o tratamento com diferentes concentrações do extrato bruto/frações e incubada por 48h sob as mesmas condições. Por fim, foi realizada a fixação com metanol por 20 min, coradas com Giemsa 5% por 20 min e colodadas em lâmina de vidro. A contagem foi realizada em microscópio óptico. A concentração inibitória 50% (CI₅₀) foi determinada em relação ao controle.

Avaliação da citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos J774A.1

O ensaio de viabilidade celular foi realizado frente às células de macrófagos J774A.1, utilizando a metodologia de redução do MTT. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^5 céls/mL), e após 24 h foram tratadas com diferentes concentrações de extrato/frações. Após 48 h, foram adicionado 50 µL de MTT (2 mg/mL) e incubado na ausência de luz por 4 h. Então, o sobrenadante foi retirado e adicionado 150 µL de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro, em 570 nm. A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada em relação ao controle.

Resultados e Discussão

O extrato bruto produzido a partir dos capítulos florais secos de *M. chamomilla*, por meio da extração com etanol 96%, foi obtido com sucesso, com um rendimento de 28,16 g. A partição do extrato bruto resultou nas frações hexânica (50,6% ou 12,66g), acetato de etila (21% ou 5,7g) e hidrometanólica (26% ou 6,7g). Ademais, os experimentos realizados com as formas de *L. amazonensis* e macrófagos foram realizados com êxito, estes estão expressos como média ± desvio padrão na Tabela 1.

Nos ensaios de citotoxicidade para macrófagos foi observado por meio dos valores de CC₅₀, que o extrato bruto e a fração acetato de etila foram as que apresentaram valores mais baixos, com 74,4 e 84 µg/mL, respectivamente, sendo as mais citotóxicas. E a fração hidrometanólica foi a menos citotóxica, com o valor de 734,16 µg/mL.

Em relação a atividade frente as formas evolutivas de *L. amazonensis*, foi possível verificar que fração hexânica foi a que apresentou os melhores resultados, uma vez que o seu CI₅₀ para as formas promastigotas foi de 14,2 µg/mL, com consequente índice de seletividade de 8,15, resultado esse que indica que a fração é 8,15 vezes mais seletiva para o protozoário do que para as células de macrófagos. Já frente as formas amastigotas a fração hexânica também foi a que apresentou o melhor resultado, com o CI₅₀ de 53,84, e um índice de seletividade de 2,13.

Tabela 1. Avaliação do CI₅₀ do extrato bruto e das frações frente às células de macrófagos e às formas promastigota e amastigotas de *L. amazonensis*.

	Macrófagos CC ₅₀ (µg/mL)	Promastigot as CI ₅₀ (µg/mL)	IS	Amastigotas CI ₅₀ (µg/mL)	IS
--	--	---	----	---	----

Extrato Bruto	74,4 ± 3,81	68,96 ± 4,00	1,07	> 100	---
Fração Hexânica	115,83 ± 10,86	14,2 ± 1,17	8,15	53,84	2,13
Fração Acetato de etila	84 ± 2,82	30,43 ± 4,70	3,09	---	---
Fração Hidrometanólica	734,16 ± 62,14	725,8 ± 98,86	1,01	> 100	---

Conclusões

Com os resultados obtidos foi possível constatar que se alcançou um bom rendimento do extrato bruto de *M. chamomilla* e obtenções ainda melhores das frações hexânica, acetato de etila e hidrometanólica. Além disso, foi possível concluir que a fração hexânica foi a que apresentou melhores resultados com atividade antileishmania in vitro, portanto, seria uma boa candidata para prosseguir com mais estudos, os quais possibilitem a elucidação das características de atividade dessa fração frente à *L. amazonensis*.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, que sempre me deu apoio incondicional em todos os meus projetos. Ao meu orientador, professor Dr. Celso Vataru Nakamura, pela oportunidade e por todos os recursos necessários para que esse projeto fosse desenvolvido. A minha co-orientadora, Dra. Thaysa Ksiaskiewicz Karam, por todo o apoio e ajuda nas diversas atividades realizadas durante minha pesquisa. Por fim, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação ao programa.

Referências

ESCH AND PETERSEN. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology**, vol. 26, p. 58-55, 2013.

JAFFARY F., et al. A comparison between the effects of glucantime, topical trichloroacetic acid 50% plus glucantime, and fractional carbon dioxide laser plus glucantime on cutaneous leishmaniasis lesions. **Dermatology Research and Practice**, vol. 2016, p. 6462804, 2016.

ORYAN A., BAHRAMI S., BEMANI E. Emerging role of amiodarone and dronedarone, as antiarrhythmic drugs, in treatment of leishmaniasis. **Acta Tropica**, vol. 185, p. 34-41, 2018.

SERENO D., HARRAT Z., EDDAIKRA N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate *Leishmania* drug resistance phenotyping into the clinic. **Acta Tropica**, vol. 191, p. 204-211, 2019.

SINGH O., et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. **Pharmacognosy Reviews**, vol. 5, p. 82, 2011.