

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Stevia leptophylla* FRENTE A PROMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum*

Maria Eduarda Passos Galacini¹ (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isabella Cavalcante dos Santos², Debora Cristina Baldoqui², Rodolfo Bento Balbinot¹ (Coorientador), Celso Vataru Nakamura¹ (Orientador). E-mail: cvnakamura@uem.br

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

²Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas Maringá, PR.

Ciências da Saúde/ Microbiologia/ Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Leishmaniose; Produtos naturais; Extratos de plantas.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas, e os tratamentos disponíveis contam com o uso de antimoniais pentavalentes, que não apresentam boa eficácia e possuem alta toxicidade, o que reforça a busca por alternativas terapêuticas. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de 15 amostras obtidas da planta *Stevia leptophylla*, sendo 9 extratos e frações e 6 substâncias isoladas, frente à promastigotas de *Leishmania infantum*, bem como sua citotoxicidade em macrófagos, e avaliar os possíveis mecanismos de ação. Através dos estudos, foi possível determinar a concentração inibitória para 50% dos protozoários (CI₅₀) de cada amostra, destacando-se o extrato bruto (EB), que apresentou um CI₅₀ de 27,28 µg/mL. O fracionamento do extrato bruto em subfrações e até mesmo o isolamentos de algumas substâncias não foi capaz de potencializar o efeito observado no EB. Com base nesses resultados, foram conduzidos estudos de mecanismo de ação exclusivamente com o EB, onde foi possível detectar espécies reativas de oxigênio (ERO), alterações no potencial de membrana e a presença de corpos lipídicos. Ainda, as análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram mudanças estruturais nos parasitos tratados, incluindo encurtamento do flagelo, diminuição do volume celular e irregularidade na membrana, confirmando o potencial leishmanicida do extrato. Desta forma, os resultados obtidos indicam que o extrato de *S. leptophylla* pode ser uma fonte promissora de moléculas bioativas para o desenvolvimento de fármacos contra a leishmaniose.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que são transmitidas pelo mosquito fêmea dos flebotomíneos. A transmissão é dada pela ingestão de sangue contaminado de amastigotas de *Leishmania* por esses insetos, que, posteriormente, se modificam em promastigotas no intestino médio dos mesmos, forma evolutiva que é capaz de

infectar o hospedeiro (REI, 2008). Essa doença apresenta uma variedade de manifestações clínicas, caracterizadas em três situações: cutânea, mucocutânea e visceral, sendo esta última a mais grave. São caracterizadas por lesões na pele, mucosa e aumento de órgãos, como o baço e o fígado, respectivamente. Segundo a OMS, os casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, África Oriental e Índia, estimando que 50.000 a 90.000 casos novos. Enquanto a leishmaniose cutânea, tem maior incidência nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, com uma estimativa de 600.000 a 1 milhão de novos casos (WHO, 2024). O tratamento para as leishmanioses é baseado no uso dos antimoniais pentavalentes, anfotericina B (forma lipossomal) e mais recentemente a miltefosina. No entanto eles apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais, além da dificuldade de administração que na maioria das opções é de forma endovenosa. Logo, a busca por diferentes tratamentos é de suma importância para que haja uma maior eficácia no combate a estas doenças. Com isso, o uso de plantas medicinais tradicionais é uma alternativa promissora como fontes de novos medicamentos e moléculas seguras e eficazes (AFONSO et al, 2023). *Stevia leptophylla* Sch. Bip. ex Baker é uma erva nativa do Brasil não endêmica, sendo confirmada sua presença no Sul do estado do Paraná e no estado de São Paulo (CNCFLORA, 2023). Até agosto de 2025, não há registros na literatura de estudos químicos ou biológicos desta espécie de *Stevia*. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a atividade antileishmaniana de extratos, frações e substâncias isoladas de *S. leptophylla*, bem como avaliar os possíveis mecanismos de morte celular da amostra mais ativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células e obtenção dos compostos

Formas promastigotas de *L. infantum* foram mantidas em meio de cultura Warren e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 25 °C. Os macrófagos foram cultivados em meio RPMI-1640, com adição de 10% de SFB, mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Os extratos e frações de *Stevia leptophylla* foram obtidos com o Grupo de Síntese e Produtos Naturais (GSPN) do departamento de química da UEM.

Avaliação da atividade antiproliferativa em formas promastigotas de L. infantum e citotoxicidade dos compostos

Promastigotas de *L. infantum* (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e frações por 72 h a 25 °C, com a viabilidade celular determinada pelo ensaio de XTT. Para a avaliação da citotoxicidade, os macrófagos (5×10^5 células/mL) foram incubados por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ até a formação da monocamada. As células foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos e incubadas por 48 h nas mesmas condições. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de MTT.

Deteção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas por 24 h com a concentração de Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$ do extrato bruto. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e incubadas com o marcador H_2DCFDA (10 $\mu g/mL$) por 1 h a 25 °C. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como controle positivo. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro Victor X3. Os dados foram normalizados pela contagem de célula.

Avaliação das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com o IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. Após a centrifugação e lavagem com PBS, as células foram fixadas por imersão com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidas em lamínulas cobertas com poli-L-lisina. Depois, foram lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol e submetidas a secagem ao ponto crítico. Por fim, foram metalizadas com ouro para serem visualizadas no microscópio Quanta 250 (FEI).

Determinação do potencial de membrana

Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas por 24 h com o Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$. As células foram lavadas e ressuspensas com PBS e marcadas com iodeto de propídeo (2 $\mu g/mL$). Para o controle positivo, foi adicionado digitonina (40 μM) e as células foram incubadas no escuro por 5 min. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro Victor X3 e os dados foram normalizados com contagem de célula.

Detecção da presença de corpos lipídicos

Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas por 24 h com a concentração do Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$. Para o controle positivo foi adicionado H_2O_2 na concentração de 1 μM e as células foram ressuspensas em PBS e incubadas com o marcador vermelho do Nilo (10 $\mu g/mL$) por 30 min. Em seguida as células foram lavadas e a leitura realizada em espectrofluorímetro Victor X3, os dados foram normalizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O EB de *S. leptophylla* apresentou o menor valor de Cl_{50} (27,38 $\mu g/mL$) em comparação aos valores obtidos para as frações e substâncias isoladas, sugerindo um possível efeito sinérgico entre os metabólitos da matriz original. No ensaio de citotoxicidade em macrófagos, todos os compostos exibiram valores elevados de CC_{50} , indicando baixa toxicidade. O extrato de flores foi o mais tóxico ($CC_{50}=119,16$ $\mu g/mL$), enquanto a fração hidroetanólica foi a menos tóxica ($CC_{50}=372,42$ $\mu g/mL$). A análise do índice de seletividade (IS), mostrou que apenas o extrato bruto e o extrato de folhas apresentam IS mais elevados, indicando que são 7 vezes mais seletivos para os parasitos do que para os macrófagos. Com base nos bons resultados obtidos para o extrato bruto, ele foi selecionado para avaliação dos efeitos bioquímicos e morfológicos sobre as promastigotas de *L. infantum*.

Para a avaliação de ERO, as concentrações de Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$ apresentaram aumento significativo na produção de ERO em relação ao grupo não tratado, comparável ao efeito do H_2O_2 , indicando que o composto tem potencial para induzir o estresse oxidativo. A integridade da membrana celular também foi avaliada, com um aumento significativo de fluorescência nos dois grupos tratados em relação ao controle negativo, indicando a descontinuidade da membrana. O mesmo foi observado para o tratamento com digitonina, utilizado como controle positivo, embora de forma mais controlada. Os tratamentos também induziram o acúmulo de corpos lipídicos, até de forma mais expressiva que o controle positivo. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou alterações morfológicas nas células tratadas, incluindo encurtamento do flagelo e diminuição do volume celular, além de irregularidades na membrana, em comparação ao controle negativo. Resultados esses que indicam que o tratamento com o EB desencadeou um processo de estresse oxidativo que foi incompatível com a viabilidade dos protozoários.

CONCLUSÕES

Dada a escassez de tratamentos eficazes e seguros para a leishmaniose visceral, investigamos extratos, frações e substâncias isoladas da planta *S. leptophylla* contra promastigotas de *L. infantum*. O EB de *S. leptophylla* se destacou na atividade antiproliferativa, apresentando o menor valor de Cl_{50} provavelmente resultado do efeito sinérgico dos componentes no extrato, além de possuir a melhor seletividade contra *L. infantum*. O extrato bruto também desencadeou alterações morfológicas nas promastigotas, assim como, foram observados aumento na produção de ERO, acúmulo de corpos lipídicos e perda da integridade da membrana celular, fatos esses que levam a morte do protozoário por meio do estresse oxidativo. Assim, a *S. leptophylla* surge como uma fonte promissora de candidatos para o tratamento da leishmaniose, embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar completamente seu mecanismo de ação e validar sua eficácia em modelos clínicos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AFONSO, R. C.; YIEN, R. M. K.; DE SIQUEIRA, L. B. O.; SIMAS, N. K.; MATOS, A. P. S.; RICCI-JÚNIOR, E. Promising natural products for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A review of in vitro and in vivo studies. **Exp. Parasitol.** 251, 108554, 2023.

CNCFlora. *Stevia leptophylla* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Acesso em: 1 jul. 2025.

REY, L. **Parasitologia**, 4 edição. Grupo GEN, 2008. E-book., 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Leishmaniasis. Disponível em:
<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acessado em 17
Ago de 2025.