



**FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS, EXATAS E DA SAÚDE DO PIAUÍ
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO VALE DO PARNAÍBA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA**

**Felipe Bringel Storari
Maria Júlia Lima Da Nóbrega
Mariana Teles Tomaz**

AVALIAÇÃO ANTI-LEISHMANIA DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA

**PARNAÍBA-PI
2021**

AVALIAÇÃO ANTI-LEISHMANIA DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Medicina da FAHESP/IESVAP, como requisito básico para obtenção do Grau de Bacharelado em Medicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Leiz Maria Costa Verás

PARNAÍBA-PI

2021

AVALIAÇÃO ANTI-LEISHMANIA DO ALCALÓIDE EPIISOPILOTURINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Medicina da FAHESP/IESVAP, como requisito básico para obtenção do Grau de Bacharelado em Medicina.

Parnaíba, 01 de junho de 2021.

RESUMO

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica pertencentes ao grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). No Brasil, a leishmaniose é uma doença com uma diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresentam diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle já que são conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo mais de 20 patogênicas ao homem. Diante disso, após a indústria farmacêutica pesquisar de forma aprofundada o jaborandi, já que há registros que essa planta nativa foi utilizada pelos índios para o estímulo da produção de secreções das glândulas exócrinas no organismo após a picada de cobras, descobriu-se que a espécie jaborandi - *Pilocarpus microphyllus* possui atividade antileishmania. Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de atividade in vitro contra as cepas de *Leishmania* com epiisopiloturina (EPI na concentração de 50 µm) - um alcaloide extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus*. A utilização da EPI foi efetiva em inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* frente a outras cepas. Os resultados sugerem que a EPI é uma substância com atividade antileishmania in vitro promissora e candidata a ser investigada em doses variadas.

Palavras-chave: Epiisopiloturina; Jaborandi; Leishmania.

ABSTRACT

Leishmaniasis are anthroponosis considered a major public health problem and represent a complex of diseases with an important clinical spectrum and epidemiological diversity belonging to the group of Neglected Tropical Diseases (NTDs). In Brazil, leishmaniasis is a disease with a diversity of agents, reservoirs and vectors that present different transmission patterns and a still limited knowledge about some aspects, which makes it difficult to control since more than 30 species of *Leishmania*, of which more than 20 are pathogenic to humans. Therefore, after the pharmaceutical industry researched jaborandi in depth, since there are records that this native plant was used by the Indians to stimulate the production of secretions from the exocrine glands in the body after snakebite, it was discovered that the species jaborandi - *Pilocarpus microphyllus* has antileishmania activity. In view of the above, the present work aims to evaluate the applicability of the in vitro activity technique against *Leishmania* strains with epiisopiloturine (EPI at a concentration of 50 μm) - an alkaloid extracted from the leaves of *Pilocarpus micrphyllus*. The use of EPI was effective in inhibiting the growth of promastigote forms of *L. amazonensis* against other strains. The results suggest that EPI is a substance with promising in vitro antileishmanial activity and a candidate to be investigated at different doses.

Keywords: Epiisopiloturine; Jaborandi; *Leishmania*.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BOD – Biochemical Oxygen Demand

CC50 – concentração de citotoxicidade média

CE50 – concentração efetiva média

CI50 – concentração inibitória média

DMEM – Meio Dulbecco's Modified Eagle's

DMSO – dimetilsulfóxido

DSS - Dodecil sulfato de sódio

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA - Ensaio Imunoabsorvente Enzimático

EPI - epiisopiloturina

EROs – espécies reativas de oxigênio

IL – interleucinas

MTT – brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2y l)-2,5-difenil tetrazolium]

NO - óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

SFB – soro fetal bovino

TNF- α – fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. 15-8

2. 58-10

3. 710

4. Erro! Indicador não definido.11

REFERÊNCIAS

11-12

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, porém, não contagiosa, causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, que acompanha a humanidade desde a antiguidade e que tem apresentado um aumento importante no número de casos, e na sua extensão geográfica, tanto nacionalmente quanto a nível mundial (NEVES, 2004; BRASIL, 2007; CAETANO, 2019).

A leishmaniose é considerada majoritariamente uma doença tropical, sendo mais comum em países de clima quente e úmido. Que por sua vez, é importante analisar os tipos de agentes etiológicos, que são compreendidos como protozoários, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), seus tipos e classificação são, Leishmaniose tegumentar Americana: *Leishmania (V) braziliensis*, com manifestações de lesões cutâneas e nas mucosas. *L. (L) amazonenses*, com manifestações de lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas). *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) shawi*, *L. (V) naiffi*, essas por sua vez, apresentam manifestações predominantemente de lesões cutâneas. Além destas, há a Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo, seus parasitas são, *L. (L) tropica*, *L. (L) major*, com manifestações predominantemente de lesões cutâneas, e *L. (L) aethiopica*, com manifestações predominantemente de lesões cutâneas e menos frequente oronasal. Leishmaniose visceral Americana tem como parasitas a *L. (L) donovani* sendo mais reconhecida como uma antroponose, também as *L. (L) infantum* e *L. (L) chagasi*, reconhecida como zoonoses. Esses tipos de leishmanioses apresentam manifestações de forma visceral com febre, anemia, hepatoesplenomegalia e emagrecimento, principalmente. As denominações “V e L” são subgêneros em que Viannia (V) e Leishmania (L) (NEVES, 2004; BRASIL, 2007; CAETANO, 2019).

Esta doença afeta grande parte das classes mais baixas e está associada à desnutrição, deslocamento de população, condições precárias de habitação, saneamento precário, déficit no sistema imunológico, falta de recursos financeiros. Ligado também a mudanças ambientais, como o desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização (NEVES, 2004; BRASIL, 2007; CAETANO, 2019).

A transmissão da leishmaniose está associada a um hospedeiro intermediário, considerados como reservatório etiológico, que está infectado pelo parasita, podendo ou não apresentar manifestações evidentes aos animais. Sendo eles os animais silvestres, como por exemplo, roedores, marsupiais, xenartros e canídeos. Os animais domésticos também podem ser hospedeiros intermediários, que ao apresentar estágios crônicos, podem ter manifestações cutâneas semelhantes à dos humanos em região de mucosa e perianal da doença, sendo eles, os caninos, felinos e equinos (NEVES, 2004; BRASIL, 2007; CAETANO, 2019).

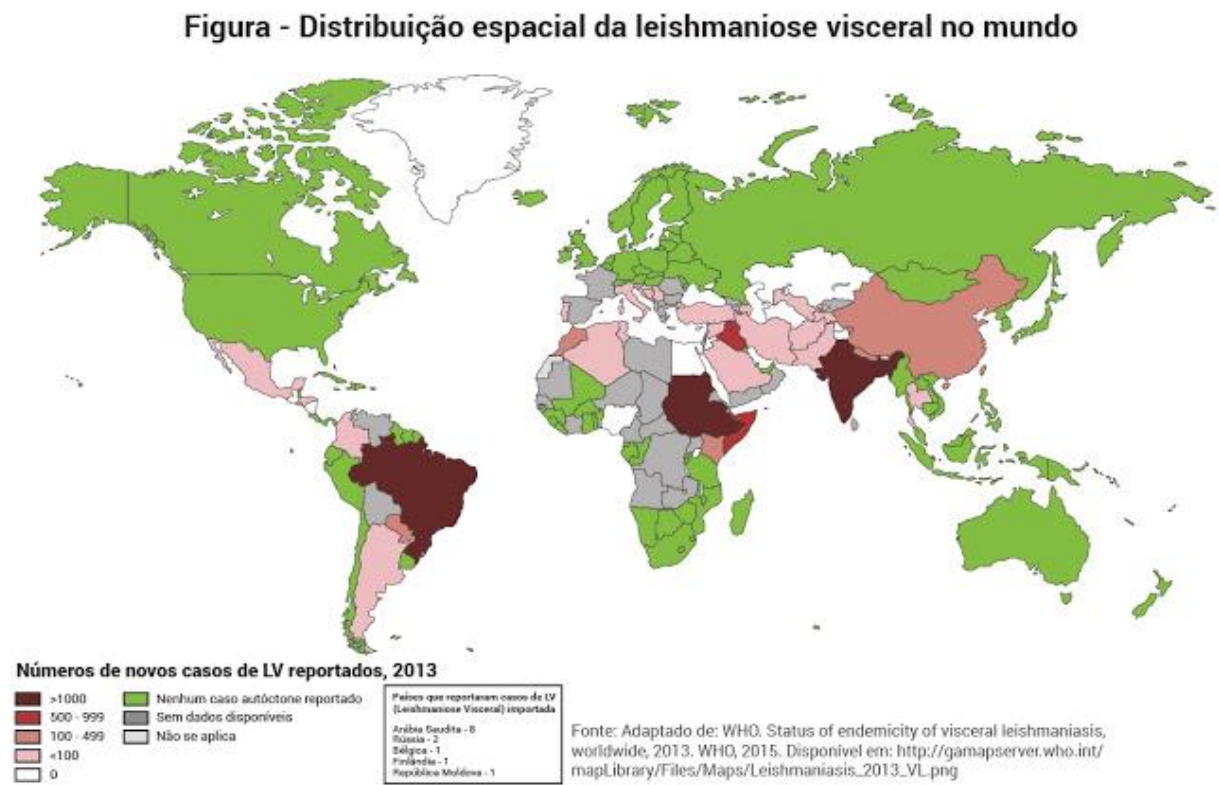
Os hospedeiros definitivos que são por sua vez considerados os vetores dessa doença, disseminando então essa doença entre mamíferos (hospedeiros intermediários e seres humanos). É de importância ter o conhecimento que as formas infectantes do parasita é a chamada promastigota, através da picada da fêmea das seguintes espécies, de acordo com seus tipos são: da Leishmaniose tegumentar Americana os insetos invertebrados: *Lutzomyia whitmani*, *L. wellcomei*, *L. pessoai*, *L. intermedia*, *L. umbratilis* e *L. flaviscutellata*. Já da Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo: *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti*, *P. chabaudi* e *P. perfilliai*. E diante da Leishmaniose visceral Americana: *Lutzomyia longipalpis* (NEVES, 2004; BRASIL, 2007; CAETANO, 2019).

Justificativa

Instalada por volta de 88 países, sendo que 72 destes estão em desenvolvimento, localizados nas Américas, Europa, África e Ásia, a Leishmaniose se tornou um problema evidente em que, por ano, é diagnosticado de 1 a 1,5 milhões de pacientes doentes. Sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades. (OMS, 2007)

Está entre as 17 doenças das classes de patógenos infecciosos e parasitários, compostas por protozoários, vírus, bactérias e helmintos, que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são chamadas DTNs. As *Leishmanioses* estão relacionadas a quesitos geográficos, econômicos e sociais, onde estão diretamente interligadas ao nível de pobreza e vulnerabilidade social. (OMS, 2007)

FIGURA 1- Distribuição dos casos humanos notificados de leishmaniose visceral no mundo no ano de 2015. Extraído de WHO (2017).



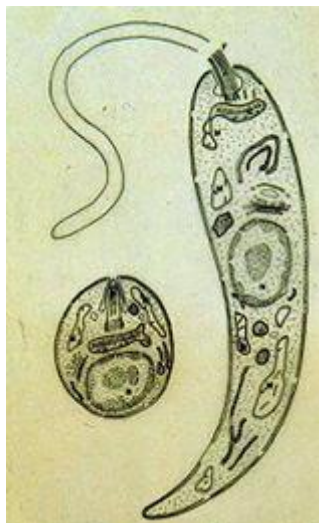
<https://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2015morais-rccs.pdf>

Parasito e vetor

A *Leishmania* é um protozoário que apresenta dimorfismo variando de acordo com ambientes extras e intracelulares com seu ciclo de vida digenético, onde uma parte acontece em hospedeiro invertebrado e outra em hospedeiro vertebrado. Apresenta duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor onde no hospedeiro, no qual esta forma é fagocitada pelos macrófagos e transformam-se em amastigotas, capazes de multiplicarem-se no meio ácido encontrado no trato digestivo das células fagocitárias; e a outra forma é aflagelada ou amastigota, no qual multiplicam por divisão binária até provocarem o

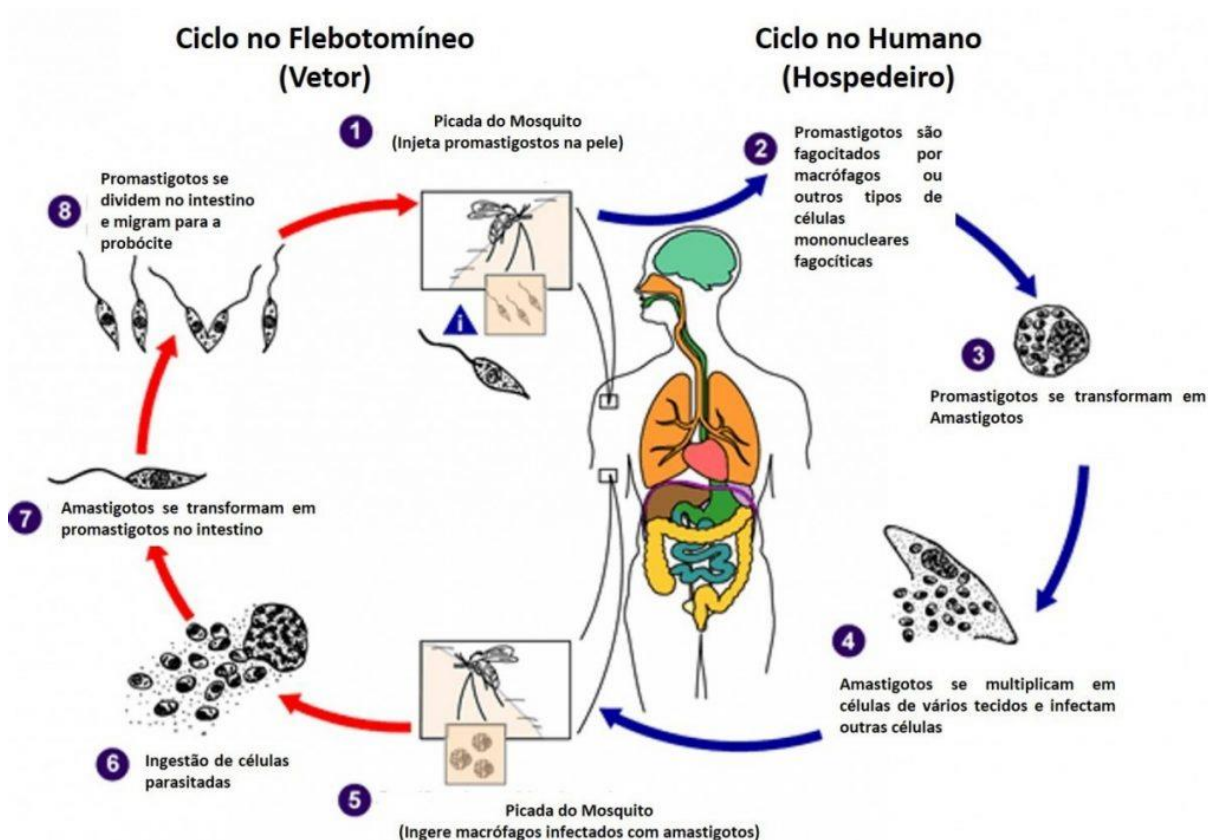
rompimento da célula. Este último processo de divisão pode ser observado nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre estes, o homem. (Megid et al., 2018; Rocha; Shiosi; Freitas, 2020).

Figura 2- Representação da forma amastigota e promastigota respectivamente.



Fonte: Luis Rey – Parasitologia Médica

Figura 3- Ciclo biológico de *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (CDC).

Jaborandi

O gênero *Pilocarpus* engloba os arbustos da família Rutaceae, que apresenta grande uso na medicina popular e alto valor cultural, sobretudo para os povos indígenas da Amazônia. As moléculas isoladas destas plantas já possuem ações farmacológicas comprovadas para o tratamento de algumas patologias e a ação biológica promovida pelo uso medicinal do jaborandi está relacionada aos metabólitos secundários presentes nestas espécies vegetais, como os alcalóides, cumarinas, flavonóides e terpenos. (SANTOS; Moreno 2004)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento da EPI

A EPI foi isolada do resíduo industrial da indústria farmoquímica Vegeflora no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do

Delta do Parnaíba - UFDPAR, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com Veras et al (2013).

2.2 Parasitas

Parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidos in vitro na sua forma promastigota em meio Schneider para insetos (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH 7, a 26 ± 1 °C em incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD) (Eletrolab EL202, São Paulo, Brasil) e repicadas semanalmente, não ultrapassando vinte repiques. A cepa de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. major* e *L. infantum* foram cedidas pelo Professor Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho do Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI. Além da manutenção das cepas in vitro, culturas de formas promastigotas em início de fase estacionária (4 dias) foram acrescidas de 10% de glicerol estéril (Amresco, Ohio, EUA) sob agitação constante por 15 min e então os parasitos foram criopreservados em freezer a -80 °C e nitrogênio líquido a -196 °C, para utilizações futuras. Para a recuperação das promastigotas criopreservadas, de acordo com a necessidade, as culturas eram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 µL eram inoculados em 1 mL de meio Schneider suplementado e mantidas à 26 ± 1 °C.

2.3 Atividade antileishmania da EPI sobre formas promastigotas

A inibição do crescimento de formas promastigotas foi avaliada com base em Rodrigues et al. (2015). Formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^6 parasitos/poço) contendo 100 µL de meio Schneider suplementado, em duplicata, contendo uma concentração de EPI (50 µM), ou fármacos de referência antimoniato de meglumina (200 a 40000 µM) e anfotericina B (0,031 a 2 µM). As placas foram incubadas em BOD a 26 °C para promastigotas por 72 h. Após o período de tratamento, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram aplicados em cada poço para estabelecer a avaliação colorimétrica da inibição de

crescimento. Em seguida a placa foi novamente incubada por mais 4 h, seguidamente recebendo a adição de 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10 % (p/v em água destilada) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 540 nm (modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil). O controle negativo foi realizado com meio Schneider suplementado e contendo 0,2 % de DMSO, considerado como 100 % de viabilidade das leishmanias.

2.4 Análise Estatística

As diferentes concentrações médias sobre formas promastigotas (CI50), amastigotas (CE50) e macrófagos (CC50) foram calculadas por regressão não linear. Para comparações entre grupos foram realizadas as análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey através de um programa estatístico, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

3. Resultados e discussão

Frente aos resultados obtidos observou-se que a EPI, apresenta uma atividade antileishmania contra uma das cepas testadas, a *L. amazonensis*. A EPI conseguiu inibir o crescimento das formas promastigotas do parasita em concentrações de 50 µM. Em consonância, a investigação da atividade antileishmania da naftoquinona isolada das raízes da espécie *C. polycephala* in vitro da CORE sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. CORE foi efetiva em inibir o crescimento das diferentes formas evolutivas do parasito em concentrações mais baixas do que outras naftoquinonas consideradas como compostos anti leishmania promissores. Por exemplo, as naftoquinonas diospirin e seu derivado di-epóxido, o D17, foram efetivas em inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. donovani* com CI50 de 20,7 µM e 7,2 µM respectivamente. O lapachol, outro metabólito da classe das naftoquinonas, possui atividade sobre formas promastigotas de *L. infantum* e de *L. amazonensis* com CI50 de 99,88 e 102,05 µM, respectivamente (SILVA JÚNIOR, 2019)

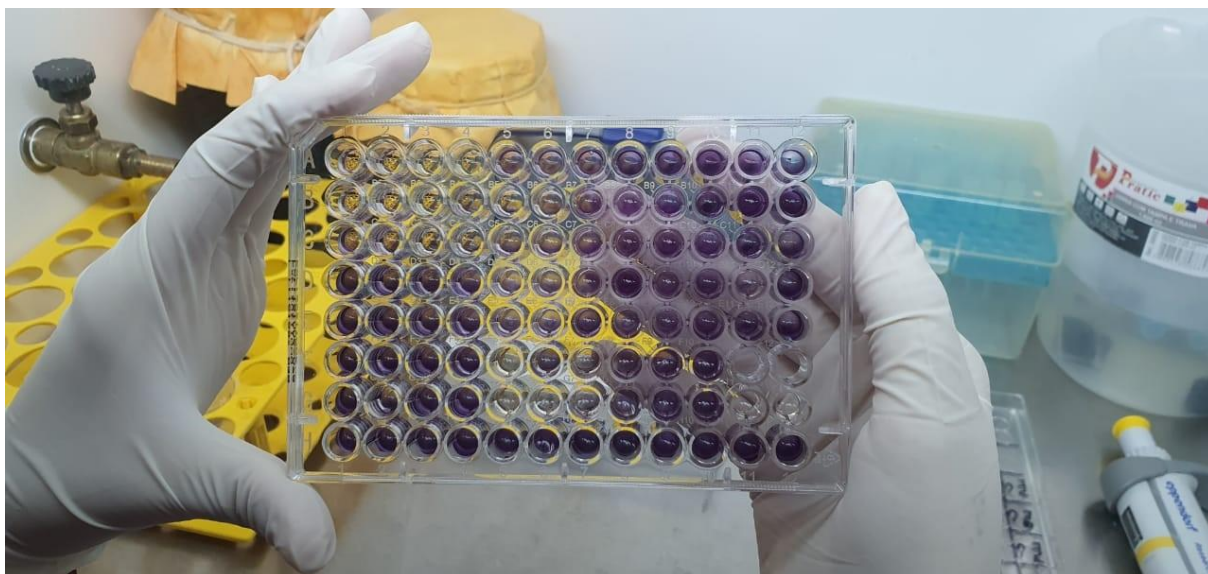


Figura 04, resultado da atividade anti leishmania do alcalóide episopiloturina. Fonte: autoria própria.

4. Conclusão

Este trabalho trata-se de um estudo experimental in vitro onde foi avaliado a atividade antileishmania, diante o alcalóide EPI isolado a partir de folhas de jaborandi em concentração única de 50 μm , capaz de agir sobre a forma promastigota metacíclica do gênero *L. amazonensis* inibindo o crescimento e proliferação das diferentes formas evolutivas do parasito.

REFERÊNCIAS:

ALTAMURA, Fernando e cols. O cenário atual de descoberta de medicamentos para tripanossomíase e leishmaniose: desafios e estratégias para identificar alvos de medicamentos. Pesquisa de desenvolvimento de drogas , v. 83, n. 2, pág. 225-252, 2022.

CAETANO, Déborah Cláudia et al. PARÂMETROS CLÍNICOS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v. 16, n. 29, 2019.

CÁPOLI, ELAINE ALVES; VIEIRA, TATIANA REIS. O uso de Pilocarpus (jaborandi) na área farmacêutica. 2019.

DE MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga et al. Análise comparativa do potencial alelopático do óleo essencial de Thymus vulgaris e seu constituinte majoritário na germinação e vigor de sementes de alface (Lactuca sativa L.). e-xacta, v. 8, n. 2, p. 45-53, 2015.

DE ANDRADE, Antero Silva Ribeiro et al. Leishmania (Leishmania) amazonensis: purificação e caracterização enzimática de uma serina oligopeptidase solúvel de promastigotas. Parasitologia experimental , v. 89, n. 2, pág. 153-160, 1998.

DE ARAUJO SOUSA, Paulo Sérgio et al. Prospeção científica e tecnológica de Pilocarpus microphyllus e do alcaloide epiisopiloturina com ênfase na atividade antileishmania. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento , v. 10, n. 7, pág. e59810716984-e59810716984, 2021.

Freitas, CD, Silva, RO, Ramos, MV, Porfírio, CT, Farias, DF, Sousa, JS, ... & Grangeiro, TB (2020). Identificação, caracterização e atividade antifúngica de cisteína peptidases do látex de Calotropis procera. Fitoquímica , 169 , 112163.

HAZRA, Sudipta et al. Avaliação de um derivado de diospirina como agente antileishmania e potencial modulador da ornitina descarboxilase de Leishmania

donovani. *Parasitologia experimental*, v. 135, n. 2, pág. 407-413, 2013. Link, H., Bernauer, K., & Oberhänsli, W. E. (1974). Configuration of *Pilocarpus* alkaloids. *Helvetica chimica acta*, 57(7), 2199-2200.

LUCIO, EMR de A.; SHARAPIN, N.; FRANÇA, H. S. Estudo de alcalóides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 130-131, 2002.

MARINHO JÚNIOR, José Ferreira et al. Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil. 2010. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

MELO, Cybelly Marques de. Estudo in silico e in vitro do incremento de solubilidade de complexos de inclusão epissopiloturina e ciclodextrinas como alternativa inovadora no tratamento de doenças negligenciadas. 2019.

MONTEIRO, Carlos Augusto et al. Vigitel Brasil 2006: vigilância de fatores e risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. 2007.

PELLISSARI, Daniele Maria et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011. Rocha, S. T. F. D., Shiosi, R. K., & Freitas, A. B. M. (2020). Canine visceral leishmaniasis-literaturere view. *R. cient. eletr. Med. Vet.*, 13-p.

SILVA, ARRA et al. Constituintes químicos de *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 2, 2019.

SANTOS, Ana Paula; MORENO, Paulo Roberto Hrihorowitsch. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, v. 40, p. 116-137, 2004.

ZAHEDIFARD, Farnaz; RAFATI, Sima. Perspectivas para abordagens de imunoterapia baseada em peptídeos antimicrobianos no controle de Leishmania. Revisão especializada de terapia anti-infecciosa , v. 16, n. 6, pág. 461-469, 2018.