

Atividade leishmanicida de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg

Leishmanicidal activity of Aspidosperma nitidum Benth. Ex Müll. Arg

Actividad leishmanicida de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg

Recebido: 03/02/2021 | Revisado: 13/02/2021 | Aceito: 17/02/2021 | Publicado: 26/02/2021

Andreza do Socorro Silva da Veiga

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3911-7471>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: assv1977@gmail.com

Fernando Tobias Silveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0412-6060>
Instituto Evandro Chagas, Brasil
E-mail: fernandotobias@iec.gov.br

Andrey Moacir do Rosario Marinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8981-0995>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: andrey@ufpa.br

Rafaela Cabral dos Santos da Trindade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9938-3333>
Universidade Federal do Pará
E-mail: rafa.bio@hotmail.com

Marliane Batista Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3802-8765>
Instituto Evandro Chagas, Brasil
E-mail: marlianecampos@iec.gov.br

Maria Fâni Dolabela

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1042-5112>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: fanidolabela20@gmail.com

Resumo

O tratamento medicamentoso da leishmaniose pode acarretar várias reações adversas e já foram encontrados isolados de *Leishmania* resistentes a terapêutica. Neste cenário, torna-se imprescindível a busca de alternativas terapêuticas e alcaloides, isolados de plantas pertencentes ao gênero *Aspidosperma*, têm se mostrado promissores como antiparasitário. O presente estudo avaliou a atividade antipromastigota, amastigota e citotoxicidade do extrato e frações pertencentes a *A. nitidum*. O extrato etanólico das cascas (EE) foi obtido por maceração e submetido a partição ácido:base, sendo obtidas as frações FN e FA. Além disso, o EE foi submetido ao fracionamento sob refluxo, obtendo-se as frações FrHEX, FrDCL, FrAcOEt e FrMeOH. A atividade antipromastigota em *L. amazonensis* e citotoxicidade para macrófagos foram avaliadas através do ensaio de viabilidade (MTT). Após a invasão dos macrófagos pelo parasito, realizou-se o tratamento com diferentes concentrações das amostras por 72 h, seguida de fixação e coloração das amostras e leitura em microscópio óptico. Somente a FrDCL mostrou-se moderadamente ativa contra promastigota (CI₅₀= 105,7±1,12 µg/mL). No entanto, o EE (CI₅₀= 23,87 ±0,87 µg/mL) e FA (CI₅₀= 18,5 ±0,94 µg/mL) mostraram-se ativos contra amastigota, enquanto que na FrDCL (CI₅₀= 204,5 ± 0,71 µg/mL) e FrHEX (CI₅₀= 143,0 ±0,82 µg/mL) observou-se atividade moderada. Quando se relaciona a citotoxicidade das amostras a atividade anti-amastigota, observa-se que o EE (CC₅₀= 491,8 + 1,86 µg/mL; IS= 21) parece ser mais promissor que a FA (CC₅₀= 209,1 + 1,7 µg/mL; IS=11). Em síntese, a *A. nitidum* mostrou-se promissora como leishmanicida.

Palavras-chave: *Aspidosperma*; *Leishmania*; Extrato; Fração.

Abstract

Drug treatment for leishmaniasis can lead to several adverse reactions, and therapy-resistant isolates of *Leishmania* have already been found. In this scenario, the search for therapeutic alternatives and alkaloids, isolated from plants belonging to the genus *Aspidosperma*, has proved to be promising as antiparasitic. The present study evaluated the antipromastigote, amastigote and cytotoxicity activity of the extract and fractions belonging to *A. nitidum*. The ethanol extract of the shells (EE) was obtained by maceration and submitted to an acid:base partition, with the FN and FA fractions being obtained. In addition, the EE was subjected to fractionation under reflux, obtaining the fractions FrHEX, FrDCL, FrAcOEt and FrMeOH. The antipromastigote activity in *L. amazonensis* and cytotoxicity to macrophages were evaluated using the viability test (MTT). After the invasion of macrophages by the parasite, the treatment was performed with different sample concentrations during 72 hours, followed by samples staining and reading under the optical microscope. Only FrDCL was moderately active against promastigotes (IC₅₀=105.7 µg/mL). However, EE (IC₅₀ = 23.87

$\mu\text{g/mL}$) and FA ($\text{IC}_{50} = 18.5 \mu\text{g/mL}$) were shown to be active against amastigote, whereas in FrDCL ($\text{IC}_{50} = 204.5 \mu\text{g/mL}$) and FrHEX ($\text{IC}_{50} = 143.0 \mu\text{g/mL}$) moderate activity was observed. When samples cytotoxicity is related to anti-amastigote activity, the EE ($\text{CC}_{50} = 491.8 \mu\text{g/mL}$; $\text{IS} = 21$) seems to be more promising than the FA ($\text{CC}_{50} = 209.1 \mu\text{g/mL}$; $\text{IS} = 11$). In summary, *A. nitidum* is promise as a leishmanicide.

Keywords: *Aspidosperma*; *Leishmania*; Extract; Fraction.

Resumen

El tratamiento farmacológico de la leishmaniasis puede provocar varias reacciones adversas y ya se han encontrado cepas de *Leishmania* resistentes al tratamiento. En este escenario, la búsqueda de alternativas terapéuticas y alcaloides, aislados de plantas pertenecientes al género *Aspidosperma*, ha demostrado ser prometedora como antiparasitario. El presente estudio evaluó la actividad antipromastigota, amastigota y citotoxicidad del extracto y fracciones pertenecientes a *A. nitidum*. El extracto etanólico de las cáscaras (EE) se obtuvo por maceración y sometido a un reparto ácido: base, obteniéndose las fracciones FN y FA. Además, el EE se sometió a fraccionamiento a reflujo, obteniendo las fracciones FrHEX, FrDCL, FrAcOEt y FrMeOH. La actividad antipromastigota en *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y la citotoxicidad para los macrófagos se evaluaron mediante la prueba de viabilidad (MTT). Tras la invasión de los macrófagos por el parásito, se realizó el tratamiento con diferentes concentraciones de las muestras durante 72 h, seguido de la fijación y tinción de las muestras y lectura al microscopio óptico. Sólo FrDCL fue moderadamente activo contra promastigote ($\text{CI}_{50} = 105,7 \pm 1,12 \mu\text{g} / \text{ml}$). Sin embargo, EE ($\text{CI}_{50} = 23,87 \pm 0,87 \mu\text{g} / \text{mL}$) y FA ($\text{CI}_{50} = 18,5 \pm 0,94 \mu\text{g} / \text{mL}$) mostraron ser activos contra amastigote, mientras que en FrDCL ($\text{CI}_{50} = 204,5 \pm 0,71 \mu\text{g} / \text{mL}$) y FrHEX ($\text{CI}_{50} = 143,0 \pm 0,82 \mu\text{g} / \text{ml}$) se observó una actividad moderada. Cuando la citotoxicidad de las muestras se relaciona con la actividad anti-amastigota, se observa que el EE ($\text{CC}_{50} = 491,8 + 1,86 \mu\text{g} / \text{mL}$; $\text{IS} = 21$) parece ser más prometedor que el FA ($\text{CC}_{50} = 209,1 + 1,7 \mu\text{g} / \text{mL}$; $\text{IS} = 11$). En resumen, *A. nitidum* se ha mostrado prometedor como leishmanicida.

Palabras clave: *Aspidosperma*; *Leishmania*; Extracto; Fracción.

1. Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários, pertencentes ao gênero *Leishmania* e com mais de 20 espécies que podem ocasionar a doença no homem. Estes parasitas são transmitidos aos seres humanos pela picada do flebotomíneo fêmea infectado, ocasionando três formas principais de leishmaniose: cutânea, visceral ou calazar e mucocutânea (WHO, 2019).

Em dezembro de 2019, 52 países endêmicos da VL (68%) notificaram a doença, sendo que mais de 90% dos casos ocorreram no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em relação a leishmaniose cutânea (LC), em 11 países ocorrem 88% dos casos notificados, dentre estes estão: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia (WHO, 2019).

Para o tratamento da leishmaniose, em geral, é utilizado o antimoniato de N-metilglucamina e alternativamente o isotionato de pentamidina e a anfotericina B. A pentamidina é mais cara que o antimonial, entretanto, o custo global do tratamento com antimonial é mais elevado, pois possui despesas indiretas, relacionadas a insumos hospitalares, eventuais necessidades de afastamento do trabalho ou internação (Naiff, et al., 1999; Neves, et al., 2011). Outros fármacos utilizados para o tratamento da LC são miltefosina, azitromicina, itraconazol, cetoconazol, alopurinol, paramomicina e pentoxifilina (Lima, et al., 2007; Neves, et al., 2011).

Várias reações adversas e efeitos tóxicos do antimonial já foram notificadas, tais como: toxicidades cardíaca (Chulay, et al., 1985; Chulay, et al., 1988), hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético (Marsden, 1994; Croft & Yardley, 2002). Alguns eventos são dose e tempo dependentes (Franke, et al., 1990). Outro aspecto negativo, relacionado ao tratamento da leishmaniose, a ser considerado é a falha terapêutica, bem como os casos de recorrências (Padrón-Nieves & Ponte-Sucre, 2015).

A resistência do parasito ao fármaco tem sido relacionada a diminuição intracelular da concentração do fármaco devido à superexpressão dos transportadores ABC (transportadores de cassetes de ligação ao ATP ou ATP-binding cassette transports; Blackmore, et al., 2001; Leslie, et al., 2005). O círculo H, descrito na *Leishmania*, é uma estrutura extracromossômica que contém genes para transportadores ABC, sendo que o aumento de sua expressão tem sido associado à

resistência aos fármacos (Padrón-Nieves & Ponte-Sucre, 2015). Diante deste cenário, torna-se urgente a busca de alternativas terapêuticas, sendo as plantas medicinais importantes fontes de novos fármacos.

O alcaloide flavopereirina, isolado de *Geissospermum vellosii* mostrou-se promissor como leishmanicida. Também, o extrato etanólico obtido desta espécie e sua fração foram ativos contra a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Silva & Silva, 2019). Alcaloides isolados de *Aspidosperma ramiflorum* foram ativos contra a *Leishmania (L.) amazonensis* (Ferreira, et al., 2004).

O presente estudo avaliou a atividade do extrato etanólico obtido de cascas de *Aspidosperma nitidum*, bem como frações que possuem alcaloides e outras frações, contra as formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis*, além disso, avaliou o potencial citotóxico destas amostras, determinando sua seletividade.

2. Metodologia

2.1 Obtenção do extrato, fracionamento e caracterização

As cascas dos troncos da espécie *A. nitidum* foram coletadas em Genipaúba, localidade de Santa Bárbara do Pará (S 01° 10' 946' W 048° 11' 715'), herborizadas e incorporadas ao Herbário MG do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob registro MG206608. A seguir, as cascas foram secas em estufa por sete dias, moídas e submetidas à maceração (7 dias). O extrato obtido foi submetido a partição ácido:base, sendo solubilizado em metanol e adicionado solução aquosa de ácido clorídrico a 3%. Esta solução foi extraída com diclorometano, obtendo-se a fração de neutros (FN). A camada aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) até potencial hidrogeniônico (pH) 9, seguida de nova extração com diclorometano, sendo obtida uma camada aquosa alcalina e uma camada orgânica (fração de alcaloides).

O extrato e as frações obtidas foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em sílica gel, utilizando-se como fase móvel diclorometano/acetato de etila/ácido fórmico (12:8:5,5), sendo visualizadas em luz Ultravioleta (UV) a 365 nm (nanômetros) e reveladas com Dragendorff. Após, para identificação das substâncias isoladas foi utilizado método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) apenas para a amostra que apresentasse manchas sugestivas de alcaloides.

Além do método de partição ácido-base, o extrato etanólico foi submetido à sistema sob refluxo. Ao extrato foi acrescentado solventes com polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) e, em seguida, este foi aquecido (40 °C) sob refluxo por 20 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes para cada solvente (Vale, et al., 2015), obtendo-se as seguintes frações: Fração hexano (FrHEX), Fração diclorometano (FrDCL), Fração acetato de etila (FrAcOEt) e Fração metanolica (FrMeOH).

Destacando-se que a metodologia desenvolvida neste estudo foi quantitativa, onde se realizou a coleta de dados quantitativos ou numéricos através do uso de medições de grandezas e por meio da metrologia obteve-se números com suas respectivas unidades. Estes métodos produzem conjuntos ou massas de dados que podem ser analisados através de técnicas matemáticas como é o caso das porcentagens, estatísticas e probabilidades, métodos numéricos, métodos analíticos e geração de equações e/ou fórmulas matemáticas aplicáveis a algum processo (Pereira, et al., 2018).

2.2 Atividade leishmanicida

A cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/M26361) foi cedida pelo Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. E a seguir, as formas promastigotas desta espécie de *Leishmania* foram primeiramente cultivadas em meio NNN (Novy-Nicolle-Mcneal) e posteriormente transferidas para o meio de crescimento RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino desnatado, penicilina G 10.000 UI (unidades internacionais)/mL

(mililitros) e estreptomicina 10.000 µg (microgramas)/mL e mantidas a 25°C ± 1°C através de passagens. Após o cultivo seguiu-se o ensaio de atividade antipromastigota e antiamastigota conforme será descrito a seguir.

No ensaio de atividade antipromastigota, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas durante a fase logarítmica de crescimento, foram centrifugadas e tiveram sua concentração ajustada para 4 x 10⁶ parasitos/100 µL (microlitros). Esta suspensão foi distribuída em placas de 96 poços que já continha as amostras a serem testadas em diferentes concentrações (200 a 3.125 µg/mL) e, a seguir, a placa foi incubada durante 72 horas (h)/26°C. O controle negativo consistiu do parasito e meio de cultura e o controle positivo do parasito e anfotericina B (25 a 0.3906 µg/mL). Após 72 h de incubação, foi adicionado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolium; 5 mg/mL) em cada poço. Decorridas 4 h de incubação, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e, a seguir, realizou-se leitura em leitor de microplacas (490 nm). A Concentração inibitória 50% (CI₅₀) foi determinada por regressão linear (Graph Pad Prism versão 5.04). Os resultados foram classificados conforme os seguintes critérios: CI₅₀ ≤ 100 µg/mL - amostra ativa, CI₅₀ entre 101 - 200 µg/mL – amostra moderadamente ativa, e CI₅₀ ≥ 200 µg/mL - amostra inativa (Mota, et al., 2015).

No ensaio de atividade antiamastigota, macrófagos obtidos do peritônio de camundongos BALB/c (com concentração ajustada para 4 x 10⁵ parasitos/50 µL) foram inicialmente mantidos em meio RPMI 1640 suplementado e, a seguir adicionados em lamínulas circulares previamente colocadas nos poços de uma placa de 24 poços (4 x 10⁵ células/50 µL). Após, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas (4 x 10⁶ parasitos) aos poços desta placa. Depois de 4 h de incubação em estufa a 35 °C/ 5% de CO₂ (dióxido de carbono), foi realizada lavagem dos poços e, adicionado meio RPMI 1640 suplementado e as amostras testadas em diferentes concentrações com base na Concentração citotóxica 50% (CC₅₀). Decorridas 72 h de incubação em estufa, as lamínulas circulares foram removidas dos poços, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. As lamínulas foram observadas ao microscópio óptico e, a seguir, foi determinado o número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula (índice de infecção).

Ressaltando-se que todos procedimentos estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal. E o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa no uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA) com parecer de aprovação n° 29/2016/CEUA/IEC/SVS/MS.

2.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por MTT (Mosman, 1983). Macrófagos obtidos do peritônio de camundongos BALB/c (concentração ajustada para 4 x 10⁵ parasitos/100 µL) foram distribuídos em placas de 96 poços e incubados a 35°C em estufa/ 5% de CO₂ durante 24 h. Após a incubação, os poços foram lavados e as células tratadas com as amostras testadas em diferentes concentrações (500 a 7,8125 µg/mL). Após 72 h de incubação, MTT foi adicionado (5 mg/mL) e as placas foram incubadas a 35°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 4 h. Depois deste período, DMSO foi adicionado a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras foi realizada em leitor de microplacas (490 nm). A porcentagem de células viáveis (macrófagos) foi calculada, conforme fórmula adaptada de Ngure, et al. (2009) e a CC₅₀ (Concentração Citotóxica 50%) foi determinada por regressão linear (Graph Pad Prism versão 5.04). Na citotoxicidade para macrófagos peritoneais estabeleceu-se os seguintes critérios: menor ou igual a 100- muito tóxico; maior que 100 e menor que 500- moderadamente tóxico; Maior ou igual a 500- baixa toxicidade (Dolabela, 2007). O índice seletividade (SI) para a atividade antipromastigota e antiamastigota foi calculado baseado razão entre CC₅₀ e CI₅₀ (Reimão, 2009).

3. Resultados

3.1 Estudo fitoquímico

O processo de extração utilizado neste estudo forneceu um rendimento de 5,1% do extrato etanólico obtido das cascas de *A. nitidum* (EE). O fracionamento do EE, através do método de partição ácido-base, levou a obtenção das frações alcaloídica (FA, rendimento = 29,25 %) e de neutros (FN, rendimento = 21,8 %). Enquanto, a extração sob refluxo gerou as frações: hexânica (FrHEX, rendimento = 2,4 %), diclorometano (FrDCL, rendimento = 8,37 %), acetato de etila (FrAcOEt, rendimento = 18,6 %) e metanólica (FrMeOH, rendimento = 38,4 %).

O EE e suas frações foram submetidas a análises por CCD, sendo observadas predominantemente manchas azuis, quando visualizadas em UV (365 nm). Visando verificar se esta fluorescência azul poderia estar relacionada aos alcaloides, as placas foram reveladas com reagente de Dragendorff, sendo observado manchas castanho-alaranjadas para o EE, FA e FrDCL.

O espectro de RMN de ^1H da fração FA demonstrou a presença de 23 sinais com deslocamentos químicos em δH 7,64, 7,61, 7,47, 7,46, 7,45, 7,41, 7,39, 7,38, 7,36, 7,33, 7,31, 7,30, 7,26, 7,19, 7,16, 7,12, 7,10, 7,08, 7,05, 6,96, 6,94, 6,91 e 6,89.

3.2 Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida *in vitro* foi avaliada em formas promastigota e amastigota de *L.(L.) amazonensis*. A fração diclorometano mostrou-se moderadamente ativa contra a forma promastigota ($\text{CI}_{50} > 105,7 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$). No entanto, o extrato e demais frações não foram ativos contra esta forma do parasito ($\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$; Tabela 1).

Ao realizar o cálculo da Concentração Inibitória 50%, verificou-se que o EE e a FA mostraram-se ativas ($\text{CI}_{50} = 23,87 \mu\text{g/mL} \pm 0,87$ e $18,8 \pm 0,94$, respectivamente) contra a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*, sendo que a fração FA foi mais ativa que o EE. Enquanto que para as frações FrHEX e FrDCL esta atividade foi moderada ($\text{CI}_{50} = 143,0 \mu\text{g/mL} \pm 0,82$ e $204,5 \pm 0,71$, respectivamente). As demais frações se mostraram inativas contra esta forma do parasito ($\text{CI}_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$; Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade anti-promastigota e anti-amastigota de *Aspidosperma nitidum*.

Amostras	Promastigota	Amastigota
	$\text{CI}_{50} + \text{DP} (\mu\text{g/mL})$	
EE	>200	$23,87 \pm 0,87$
FN	>200	>500
FA	>200	$18,5 \pm 0,94$
FrHEX	>200	$143,0 \pm 0,82$
FrDCL	$105,7 \pm 1,12$	$204,5 \pm 0,71$
FrAcOEt	>200	>500
FrMeOH	>200	>500
AB	$0,06 \pm 0,0020$	$4,4 \pm 0,9$

CI_{50} - Concentração inibitória 50%; DP - Desvio padrão; EE - Extrato etanólico; FA - Fração alcaloídica; FN - Fração de neutros; FrHEX - Fração hexano; FrDCL - Fração diclorometano; FrAcOEt - Fração acetato de etila; FrMeOH - Fração metanólica; AB - anfotericina B.
Fonte: Autores.

3.3 Citotoxicidade e seletividade

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos murinos. O EE mostrou-se menos citotóxico e mais seletivo ($CC_{50} = 491,8 \pm 1,86$; $SI = 21$) para a forma amastigota em relação a FA ($CC_{50} = 184,7 \pm 2,5$; $SI = 11$). Enquanto que, a FrHEX apresentou baixa seletividade para esta forma do parasito ($IS = 2,2$). A FrDCL apresentou seletividade para a forma promastigota superior a 4,7 e para formas amastigotas acima de 2,4 (Tabela 2).

Tabela 2 - Citotoxicidade e índice de seletividade de *Aspidosperma nitidum*.

Amostras	Citotoxicidade		Índice de seletividade (IS)	
	$CC_{50} \pm DP$ ($\mu g/ml$)	Promastigota	Amastigota	
EE	$491,8 \pm 1,86$	-	21	
FN	$209,1 \pm 1,7$	-	-	
FA	$184,7 \pm 2,5$	-	11	
FrHEX	$308,9 \pm 0,82$	-	2,2	
FrDCL	>500	>4,7	>2,4	
FrAcOEt	>500	-	-	
FrMeOH	$473,0 \pm 0,76$	-	-	
AB	>100	>1667	>22,7	

CC_{50} - Concentração citotóxica 50%; DP - Desvio padrão; EE - Extrato etanólico; FA - Fração alcaloídica; FN - Fração de neutros; FrHEX - Fração hexano; FrDCL - Fração diclometano; FrAcOEt - Fração acetato de etila; FrMeOH - Fração metanólica; AB- anfotericina B.
Fonte: Autores.

4. Discussão

Os rendimentos das frações FrHEX (rendimento = 2,4 %), FrDCL (rendimento = 8,37 %), FrAcOEt (rendimento = 18,6 %) e FrMeOH (rendimento = 38,4 %), sugere que o extrato etanólico é constituído, principalmente, de substâncias de maior polaridade. E ao analisar todas as amostras por CCD, verificou-se o predomínio de manchas azuis, quando visualizadas em UV, mas quando estas placas foram reveladas com reagente Dragendorff observou-se manchas castanho-alaranjadas apenas no EE, FA e FrDCL, sugestivas de alcaloides. Estudos químicos anteriores de *A. nitidum* levaram ao isolamento de alcaloides indólicos (Arndt, et al., 1967; Pereira^a, et al., 2006; Pereira^b, et al., 2006; Nascimento & Silveira, 2006; Nascimento, et al., 2006; Martins, 2012).

A análise do espectro de RMN de 1H da fração FA demonstrou a presença de sinais sugestivos de alcaloides indólicos, sendo que os deslocamentos químicos em δH 7,47, 7,41, 7,36, 7,30, 7,26, 7,19, 7,08, 6,96 e 6,89 foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático do sistema indólico quando comparadas com dados da literatura (Robert, et al, 1983, Verpoorte, et al., 1982, Uchoa, 2006, English & Williams, 2010, Torres, 2012).

No presente estudo, observou-se que a EE e FA não se mostraram promissores para a forma promastigota, porém foram ativos na forma responsável pela doença (Tabela 1). Indicando que atividade contra promastigotas não confere necessariamente atividade contra amastigota e vice-versa. Ambos os estágios do parasita possuem diferentes características moleculares e bioquímicas, conferindo diferenças de sensibilidade das drogas (Camacho, et al., 2002). O Pentostam, por exemplo, é efetivo contra formas amastigotas, mas não o é para promastigotas de *Leishmania* spp. (Olliaro & Brycenton,

1993). O mesmo comportamento foi observado com o alcaloide bisbenzilisoquinolínico denominado Faeantina que mostrou fraca atividade contra promastigotas, mas significativa atividade contra amastigotas (Camacho, et al., 2002).

A atividade anti-amastigota do EE e da FA, provavelmente, está relacionada aos alcaloides, pois nas frações de alcaloides de *A. nitidum* foram detectados alcaloides indólicos com características estruturais bem próximas as da desacetilaspidospermina (Martins, 2012) e iombina (Nascimento, 2013). E no extrato etanólico das cascas de *A. nitidum* já foram isolados os seguintes alcaloides: 10-metoxidiidrocorinanteol, corinanteol, heteroioimbina (Arndt, et al., 1967), ácido harmanocarboxílico (Pereira^a, et al., 2006), 3-metil-harmano carboxílico, diidrocorinanteol (Nascimento & Silveira, 2006), desidrositsirikina (Nascimento, et al., 2006) e braznitidumina (Pereira^b, et al., 2006).

Nas frações obtidas da extração sob refluxo apenas as frações FrHEX e FrDCL mostraram-se ativas contra *L. (L.) amazonensis*, sendo que só a FrDCL mostrou atividade moderada contra as duas formas evolutivas (promastigota e amastigota) de *Leishmania* (Tabela 1). Observando-se que as frações de menor polaridade obtidas por este método de extração apresentaram maior atividade leishmanicida, podendo indicar que a atividade desta planta esteja relacionada a uma(s) substância(s) de baixa ou média polaridade.

Ao analisar a placa cromatográfica contendo as FrHEX e FrDCL, observou-se manchas azuis, em ambas as frações, quando visualizadas em UV, sendo que quando a placa foi revelada com reativo de Dragendorff, apenas a FrDCL apresentou zona cromatográfica reativa a este reagente, sugerindo a presença de alcaloide nesta fração. Este fato sugere, também, que a atividade contra *Leishmania* da FrDCL pode estar relacionada a presença de alcaloides e indica que os alcaloides podem estar ausentes na fração FrHEX ou que estes poderiam estar presentes em baixas concentrações.

Diante do exposto, realizou-se RMN ¹H da fração FrHEX e de suas subfrações FrHEX1 e FrHEX2 no sentido de observar ou não sinais sugestivos de alcaloides. Ao analisar os espectros, verificou-se quatro sinais, apenas na subfração FrHEX2, em δH 7,60, 7,26, 7,19, 6,90. Ao comparar com dados da literatura, estes sinais correspondem aos hidrogênios do anel benzênico do sistema indólico, tratando-se de alcaloides indólicos (Uchoa, 2006; Torres, 2012). Então, este resultado sugere que os alcaloides podem estar em concentrações muito baixas na fração FrHEX.

Outros estudos vêm demonstrando atividade antileishmaniana dos alcaloides presentes em plantas. Verificou-se a atividade do extrato bruto hexânico de *Aspidosperma cuspa* contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* mostrando um percentual de inibição maior que 50% nas concentrações de 1, 6, 8, 40 µg/mL (Nunes, 2008). Outro estudo (Delorenzi, et al., 2001) demonstrou que o extrato e frações ricas em alcaloides indólicos tem apresentado atividade em formas promastigota e amastigota em *L. amazonensis*. A fração alcaloídica obtida das cascas do caule de *A. ramiflorum* e substâncias puras (ramiflorina A e B) mostraram-se ativas contra as formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, sendo essa atividade maior contra *L. amazonensis* (Tanaka, et al., 2007; Ferreira, et al., 2004).

Em relação a citotoxicidade do EE, pode-se sugerir que este apresente um baixo potencial citotóxico (Tabela 2) contra macrófagos de camundongo BALB/c. Em outras pesquisas desenvolvidas com espécies do gênero *Aspidosperma*, observa-se que as substâncias obtidas destas plantas quando testadas contra diferentes tipos celulares apresentam baixa ou moderada citotoxicidade ou não se mostram citotóxicas, conforme podemos observar na literatura citada a seguir. O Ext.EtOH (extrato etanólico) de *A. nitidum* e suas frações FA e FN não apresentaram citotoxicidade para células hepáticas (CC₅₀ = 410,65 µg/mL, 376,73 µg/mL e 452, 53 µg/mL, respectivamente; Martins, 2012). O extrato hidroetanólico de *A. excelsum* não ocasionou redução da viabilidade celular de fibroblastos murinos, indicando não ser citotóxico para esta linhagem celular (CC₅₀ > 6250 µg/mL) e sua fração alcaloídica C2 apresentou pequena citotoxicidade nas concentrações superiores a 800 µg/mL (Gomes, 2011). Em outro estudo, o extrato etanólico de *Aspidosperma parvifolium* demonstrou baixa citotoxicidade em culturas de células VERO (100 < CC₅₀ < 500 µg/mL; Dolabela, 2007).

A FA, apesar de apresentar uma menor CI_{50} para a forma amastigota, apresentou um maior potencial citotóxico que o EE (Tabelas 1 e 2), sugerindo que o aumento do teor de alcaloides pode estar relacionado a este fato. A fração de acetato de etila das tinturas de *Schinus terebinthifolius* e *Solidago chilensis* obtiveram maior percentual de atividade citotóxica apresentando 97,2% e 98,5%, respectivamente em comparação ao extrato etanólico destas espécies vegetais. Identificando-se maior teor de compostos fenólicos como flavonóides nas tinturas. Destacando-se que as tinturas de *S. terebinthifolius* e *S. chilensis* são usadas via oral, porém em baixíssimas concentrações, sem riscos de toxicidade (Silva, 2018).

A não identificação do(s) possível(is) alcaloide(s) envolvido(s) na atividade leishmanicida foi um fator limitante neste estudo, pois não conseguimos determinar a substância responsável por esta atividade. Estudos envolvendo métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 (RMN 1H e ^{13}C), 1D e 2D e espectrometria de massa (EM). precisam ser realizados visando a elucidação deste provável alcaloide.

5. Conclusão

Estes resultados sugerem que, realmente, o EE obtido das cascas de *Aspidoperma nitidum* é promissor como leishmanicida, requerendo estudos químicos adicionais para identificar a substância responsável pela atividade. Além disso, estes resultados corroboram com os relatos de uso popular da planta, levando a inferir sobre o potencial do extrato para obtenção de novas entidades químicas contra *L. (L.) amazonensis*.

A elucidação estrutural do possível alcaloide responsável pela atividade leishmanicida e avaliação das alterações morfológicas em *Leishmania (L.) amazonensis* ocasionadas pelas amostras ativas serão os próximos passos a serem dados nesta pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências brasileiras como Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) pelo suporte financeiro a este estudo e a professora Dra. Marlia Regina Coelho-Ferreira, pesquisadora do Museu Paraense Emílio Goeldi, (Belém, PA) pela identificação botânica da planta.

Referências

- Arndt, R. R., Brown, S. H., Ling, N. C., Roller, P., Djerassi, C., Ferreira, J. M., Gilbert, B., Miranda, E. C., Flores, S. E., Duarte, A. P., & Carrazzoni, E. P. (1967). Alkaloid studies- LVIII: The alkaloids of six *Aspidosperma* species. *Phytochemistry*, 6, 1653- 1658. doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82898-8.
- Blackmore, C. G., McNaughton, P. A., & Veen, H. W. V. (2001). Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Molecular Membrane Biology*, 18, 97-103. 10.1080/09687680010030200.
- Camacho, M. D. R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Rock, P., Marshall, S. J., Schiff Jr, P. L. (2002). *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some Bisbenzylisoquinoline Alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research*, 16, 432-436. 10.1002/ptr.929.
- Chulay, J. D., Spencer, H. C., & Mugambi, M. (1985). Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 34, 702-709. 10.4269/ajtmh.1985.34.702.
- Chulay, J. D., Fleckenstein, L., & Smith, D. H. (1988). Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 69-72. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2845611/>.
- Croft, S. L., & Yardley, V. (2002). Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 319-342. 10.2174/1381612023396258.
- Delorenzi, J. C., Attias, M., Gattass, C. R., Andrade, M., Rezende, C., Pinto, A. C., Henriques, A. T., Bou-Habib, D. C., & Saraiva, E. M. B. (2001). Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1349-1345. 10.1128/AAC.45.5.1349-1354.2001.
- Dolabela, M. F. (2007). *Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de Esenbeckia febrifuga (A.St-hil.) Juss. ex Mart. (Rutaceae) e de espécies do gênero Aspidosperma (Apocynaceae)* Tese (doutorado). Faculdade de farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

- English, B. J., & Williams, R. M. (2010). A divergent strategy for the synthesis of secologanin derived natural product. *Journal of Organic Chemistry Research*, 75, 7869-7876. doi.org/10.1021/jo101775n.
- Ferreira, I. C. P., Lonardon, M. V. C., Machado, G. M. C., Leon, L. L., Gobbi Filho, L., Pinto, L. H. B., & Oliveira, A. J. B. (2004). Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3), 325-327. doi.org/10.1590/S0074-02762004000300015.
- Franke, E. D., Wignall, S., Cruz, M. E., Rosales, E., Tovar, A. A., Lucas, C. M., Alejando, Llanos-Cuentas, M. D., & Berman, J. D. (1990). Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Annals of Internal Medicine*, 113, 934-40. 10.7326/0003-4819-113-12-934.
- Gomes, L. F. S. (2011). *Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica in vitro e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanolico das cascas de Aspidosperma excelsum Benth (Apocynaceae)*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Leslie, E., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology Applied Pharmacology*, 204, 216-237. 10.1016/j.taap.2004.10.012.
- Lima, E. B., Porto, C., Motta, J. O. C., & Sampaio, R. N. R. (2007). Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82(2), 111-124. doi.org/10.1590/S0365-05962007000200002.
- Marsden, P. D. (1994). Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia-Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27(2), 93-101. doi.org/10.1590/S0037-86821994000200007.
- Martins, T. M. (2012). *Estudo farmacognóstico, fitoquímico e atividades biológicas de Aspidosperma nitidum Benth. Ex Mull. Arg.* Dissertação (mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mota, E. F., Rosario, D. M., Veiga, A. S. S., Brasil, D. S. B., Silveira, F. T., & Dolabela, M. F. (2015). Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. *Pharmacognosy Magazine*, 11(43), 1-6. 10.4103/0973-1296.176109.
- Naiff, M. F., Cupolillo, E., Naiff, R. D., Momen, H., Barret, T. V., & Grimaldi Jr, G. (1999). Leishmaniose tegumentar americana na Amazônia: distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(1), 1-243.
- Nascimento, P. C., & Silveira, E. R. (2006). Alcalóides indólicos de *Aspidosperma nitidum*. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 31, Águas de Lindóia. Resumo. São Paulo. <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T1901-1.pdf>.
- Nascimento, P. C., Araújo, R. M., & Silveira, E. R. (2006). Aplicação da CLAE na análise fitoquímica de *Aspidosperma nitidum*. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 29., Águas de Lindóia. Resumo. São Paulo, 2006. <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T2285-2.pdf>.
- Nascimento, S. M. (2013). *Investigação fitoquímica e das atividades antioxidante e antiparasitária do extrato e frações de Aspidosperma excelsum Benth.* Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.
- Neves, L. O., Talhari, A. C., Gadelha, E. P. N., Silva Júnior, R. M., Guerra, J. A. O., Ferreira, L. C. L., & Talhari, S. (2011). Estudo Clínico Randomizado comparando antimonio de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da Leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(6), 1092-1101. 10.1590/S0365-05962011000600005.
- Ngure, P. K., Tonui, W. K., Ingonga, J., Mutai, C., Kigonda, E., Ng'ang'a, Z., Rukunga, G., & Kimutai, A. (2009). *In vitro* antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(2), 61-66. 10.5897/JMPR.9000739.
- Nunes, R. K. (2008). *Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense*. Monografia (Trabalho de conclusão de curso). Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/132885>.
- Olliaro, P. L., & Bryce, A. D. M. (1993). Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 9(9), 323-328. 10.1016/0169-4758(93)90231-4.
- Padrón-Nieves, M., & Ponte-Sucre, A. (2015). Marcadores de resistencia en *Leishmania*: Susceptibilidad *in vitro* a drogas leishmanicidas vs retención de calceína en aislados de pacientes venezolanos con Leishmaniasis Cutánea Difusa. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 34(4), 53-57. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid.
- Pereira^a, M. M., Souza Júnior, S. N., Alcântara, A. F. C., Piló-Veloso, D., Alves, R. B., Machado, P.O., Azevedo, A. O., Moreira, F. H., Castro, M. S. A., & Raslan, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(3), 1-8. https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPMRevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo1_v8_n3.pdf.
- Pereira^b, M. M., Alcântara, A. F. C., Piló-Veloso, D., & Raslan, D. S. (2006). NMR structural analysis of Braznitidumine: a new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo[7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7), 1274-1280. 10.1590/S0103-50532006000700012.
- Reimão, J. Q. (2009). *Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros*. Dissertação (mestrado). Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Robert, G. M. T., Ahond, A., Poupat, C., & Potie, P. (1983). *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloides de *Aspidosperma Marcgravianum*. *Journal of Natural Products*, 46(5), 694-707. 10.1021/np50029a018.

Silva-Silva, J.V., Brigido, H. P. C., Albuquerque, K. C. O., Carvalho, J. M., Reis, J. F., Faria, L. V., Coelho-Ferreira, M. R., Silveira, F.T., Carneiro, A. S., Percário, S., Marinho, A. M. R., & Dolabela, M. F. (2019). Flavopereirine—An alkaloid derived from *Geissospermum vellosii*—presents leishmanicidal activity *in vitro*. *Molecules*, 24(785), 1-13. 10.3390/molecules24040785.

Silva, M. G. F. 2018. *Estudo da atividade antioxidante e citotóxica do extrato etanólico, frações e tinturas comerciais de Solidago chilensis Meyen e Schinus terebinthifolius Raddi obtidos na região metropolitana do Recife-PE*. Dissertação (mestrado). Departamento de Histologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/30741>

Tanaka, J. C. A., Silva, C. C., Ferreira, I. C. P., Machado, G. M. C., Leonc, L. L., & Oliveira, A. J. B. (2007). Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine*, 14, 377-380. 10.1016/j.phymed.2006.09.002.

Torres, Z. E. S. (2012). *Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: Aspidosperma ulei Markgr.* Tese (doutorado). Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Uchoa, D. E. A. (2006). *Aplicação de técnicas contemporâneas de ressonância magnética nuclear no estudo fitoquímico de Aspidosperma ulei*. Dissertação (mestrado). Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Vale, V.V., Vilhena, T. C., Trindade, R. C. S., Ferreira, M. R. C., Percário, S., Soares, L. F., Pereira, W. L. A., Brandão, G. C., Oliveira, A. B., Dolabela, M. F. & Vasconcelos, F. (2015). Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, 14(132), 1-10. 10.1186/s12936-015-0643-1.

Verpoorte, R., Ruigrok, C. L. M., & Svendsen, A. B. (1982). Medicinal Plants of Surinam II: Antimicrobial Active Alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 46, 149—152. europepmc.org/article/med/7178295.

WHO (World Health Organization). (2019). Global Health Observatory (GHO) Data. https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.