

# Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae)

Anti-*Leishmania* and immunomodulatory potential of extracts of *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae)

Potencial anti-*Leishmania* y inmunomodulador de extracto de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae)

Anadeiva Portela Chagas  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Milena Botelho Pereira Soares  
Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil

Adolfo Henrique Müller  
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil  
Centro Universitário do Pará, Belém, Pará, Brasil

Lourdes Maria Garcez  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil  
Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil

## RESUMO

Infusões das folhas, cascas e sementes de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae) são utilizadas por comunidade de negros descendentes de escravos (quilombolas) para o tratamento, principalmente, de leishmaniose cutânea (LC), feridas, úlceras e impigens. Extratos hidroalcóolicos e aquosos de *C. laurifolia* foram investigados para a atividade anti-*Leishmania* sobre promastigotas e amastigota de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e resposta imunomoduladora: proliferação celular de esplenócitos e produção ON por macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c. Os extratos hidroalcóolicos da casca e aquosos da folha e semente apresentaram reduzida atividade contra as formas amastigotas e promastigotas (<20%) e o mesmo foi observado para a inibição da produção de ON por macrófagos ativadas (<23%). A maioria dos extratos revelou moderado potencial imunossupressor (32,6% a 38,5%), mas os extratos aquosos da semente (AS) inibiram em até 87% o crescimento de esplenócitos de BALB/c estimulados com mitógenos. Tal atividade talvez explique a indicação quilombola de *C. laurifolia* para o tratamento de LC, pois o seu uso pode não estar associado majoritariamente com uma ação direta sobre o parasito, mas sim com uma atividade anti-inflamatória, de vez que, tal atividade diminui os danos teciduais causados pelo sistema imune em resposta à infecção e, conseqüentemente, ajuda na cicatrização das lesões leishmanióticas.

**Palavras-chave:** Fitoterapia; Extratos Vegetais; Fabaceae; Leishmaniose; Imunossupressão.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, iniciadas pela inoculação das espécies do gênero *Leishmania* durante o repasto sanguíneo de insetos vetores<sup>20,7,9</sup>. Entre elas, a leishmaniose cutânea (LC) é particularmente importante na América do Sul por apresentar aspecto de cronicidade, latência e por desenvolver metástases que conduzem a quadros clínicos desfigurantes. No tratamento dessa doença, a quimioterapia com antimoniais pentavalentes é extensamente utilizada, porém efeitos adversos, administração parenteral, regimes de tratamento prolongados e aparecimento de resistência justificam a busca de drogas alternativas mais eficazes<sup>10,21</sup>.

Várias classes de substâncias já foram isoladas, tais como alcalóides, lignanas, neolignanas, terpenos e ácido benzóico, e têm-se mostrado bioativas<sup>6</sup>. Porém, dentre 97 substâncias levantadas no trabalho de Chan-Bacab e Peña-Rodriguez<sup>4</sup>, apenas 2-*n*-propylquinoline, alcalóide das folhas de *Galipea longiflora* (Rutaceae), está em fase clínica para o tratamento da LC<sup>9,10</sup>, pois a maioria das substâncias ensaiadas, *in vivo*, apresenta altos níveis de citotoxicidade e baixa atividade quando administradas em doses moderadas<sup>4,2</sup>. Contudo, tais esforços devem ser contínuos, pois a grande variabilidade de linhagens de *Leishmania* e o aparecimento de formas resistentes conduzem à necessidade de desenvolvimento de diferentes tipos de drogas<sup>10</sup>.

A espécie *Campsiandra laurifolia* Benth., uma leguminosa da família Fabaceae, é encontrada no Brasil principalmente nos Estados do Pará, Amapá e Amazonas, em áreas de igapó e às margens de igarapés e rios. A Manaiara, como é conhecida popularmente, é utilizada principalmente para o tratamento de feridas, impigem, malária, úlcera<sup>23</sup>. A comunidade de Arancuã, um dos 27

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Anadeiva Portela Chagas  
Instituto Evandro Chagas  
Seção de Parasitologia, Laboratório de Imunologia e Epidemiologia  
Rodovia BR316, km 7, s/nº, Levilândia  
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil  
E-mail: anadeivachagas@iec.pa.gov.br

remanescentes quilombos (descendentes de negros que resistiram à escravidão) dessa região, que fica às margens do rio Trombetas, próximo ao Município de Oriximiná, no oeste do Estado do Pará, frequentemente se expõem ao vetor da LC, durante três meses do ano (janeiro a março). Nessa época, seus integrantes residem em áreas de floresta, para realizarem a coleta anual da castanha-do-Pará<sup>1</sup>. Essa comunidade utiliza a infusão das folhas e a tapioca do fruto (parte amilácea obtida a partir da maceração aquosa e secagem em exposição à luz solar) para o tratamento da leishmaniose cutânea<sup>3</sup>. O uso popular, o grande número de indicações e a ausência de estudos químicos e biológicos da *C. laurifolia* sustentaram um *screening* preliminar dessa espécie. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi verificar o potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos obtidos de *C. laurifolia* de acordo com o conhecimento tradicional de comunidades quilombolas e realização de um estudo químico preliminar dos extratos que apresentaram atividades biológicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletadas folhas, cascas do caule e sementes de *C. laurifolia* no período de setembro de 2002, na comunidade de Arancuã (596083,59 E; 9833128,18 N - UTM), um dos 27 remanescentes de quilombos, situada às margens do rio Trombetas, no Município de Oriximiná no oeste do Estado do Pará, Brasil. A espécie vegetal foi selecionada a partir de um levantamento etnobotânico realizado em maio de 2002<sup>3</sup>, que teve como principal objeto identificar as espécies vegetais mais utilizadas pela comunidade para o tratamento de LC. A identificação da espécie foi realizada pela botânica Elisabeth van den Berg, herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará.

### CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As atividades de coleta foram iniciadas após a obtenção da anuência prévia da comunidade que se deu pela assinatura de um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) pelos principais representantes da comunidade.

### PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

Após a pulverização do material coletado (moinho elétrico de facas - Willey), a partir das folhas (1.000 g), foram preparados extratos aquosos utilizando água a temperatura ambiente (AFF – extrato aquoso a frio da folha) e água a 50° C (AQF – extrato aquoso a quente da folha) por maceração de oito dias, sendo que a concentração do filtrado foi feita em liofilizador. A casca do caule, 550 g, foi pulverizada em moinho e após a maceração em solvente hidroalcolóico (etanol/água - 1:1), por um período de 15 dias, o filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 50° C (HC – extrato hidroalcolóico da casca). Na preparação do extrato aquoso da semente, após a trituração (ralador doméstico) o material foi macerado em água a temperatura ambiente e imediatamente filtrado e o extrato seco obtido em

liofilizador (ASL – extrato aquoso da semente produzido em laboratório). Nesse estudo testou-se também um extrato aquoso da semente produzido por um curandeiro da comunidade, que foi denominado de ASC (extrato aquoso da semente produzido pela comunidade), pois, no preparo desse extrato, a comunidade expõe o macerado aquoso, após a trituração da semente em um ralador, à luz solar, até a evaporação total do solvente, o que resulta em um pó seco, com textura e coloração diferente do extrato obtido em laboratório. Todos os extratos obtidos foram diluídos em 1% de DMSO (Sigma, EUA) para a preparação de uma solução estoque (10 mg/mL) que foi conservada a -20° C até o momento de uso.

### ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre 2 e 3 meses (n = 1/ensaio), todos oriundos do biotério do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. Os animais sofreram eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> e éter.

### CULTIVO DOS PARASITOS

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas a 27° C em meio completo, i.e. RPMI 1640 (Sigma, EUA), contendo 10% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Gibco, EUA); L-glutamina, 2 mM (Sigma, EUA); piruvato de sódio, 1,25 mM (Merk, Alemanha); penicilina, 100 UI/mL; estreptomocina, 100 µg/mL (Sigma, EUA) e 2-mercaptoetanol, 50 µM (Gibco, EUA).

### OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS E DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Camundongos foram eutanizados com CO<sub>2</sub> ou éter, e em ambiente asséptico, ocorreu a retirada do baço ou de células residentes da cavidade peritoneal. Para obtenção de esplenócitos, o baço foi macerado em meio RPMI-1640, e em seguida, o sobrenadante desta suspensão, foi lavado duas vezes em meio RPMI-1640 (10<sup>7</sup>/1500 rpm/10° C). Os macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal em meio Hank's (Sigma, EUA) e lavados em meio RPMI-1640 por duas vezes (10<sup>7</sup>/1500 rpm/10° C). O número de células esplênicas e macrófagos após a lavagem, foi determinado com auxílio de um microscópio ótico e ajustadas de acordo com teste em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal, penicilina 100 UI/mL e estreptomocina 100 µg/mL (meio completo).

### AValiação DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS VEGETAIS

Células esplênicas (6 x 10<sup>6</sup> células/poço) foram distribuídas em placas de cultura de 96 cavidades (Costar) e incubadas (37° C/ 24 h, 5% CO<sub>2</sub> e 95% ar) em presença dos extratos vegetais (1 e 0,1 mg/mL) e <sup>3</sup>H-timidina (1 µC/poço) (Amersham Life Science, Inglaterra). Controles consistindo somente de (i) suspensão de células e meio de cultura (controle negativo) e (ii) suspensão de células e saponina (Sigma, EUA) (1 mg/mL) (controle positivo) foram utilizados. Após incubação, as células foram coletadas em membranas de fibra de vidro para contagem de

radioatividade incorporada em um contador  $\beta$  (Cilintilador, Tri-cab-2100TR, Packard). A porcentagem de células viáveis foi determinada pelo índice de citotoxicidade (IC), dado pela quantidade de  $^3\text{H}$ -timidina incorporada pelas células tratadas com extratos em relação às células do controle negativo do ensaio.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROMASTIGOTA

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, obtidas durante a fase logarítmica de crescimento (3-4 dias), foram reunidas por centrifugação e suspensas em meio RPMI completo ( $5 \times 10^7$  parasitos/mL), para posterior distribuição em uma placa de cultura de 96 cavidades. Em seguida foram incubadas ( $26^\circ\text{C}/24\text{ h}$ ) na presença dos extratos vegetais (0,1 mg/mL). Controles consistiram de: (i) suspensão de promastigotas e meio de cultura e (ii) suspensão de promastigotas e Anfotericina B (Sigma, EUA) (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após incubação, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, EUA) (5 mg/mL) foi adicionado na cultura, sucedendo-se nova incubação (3 h/ $26^\circ\text{C}$ ). A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada em espectrofotômetro, sob comprimento de onda igual a 570 nm. A porcentagem de parasitos viáveis foi determinada pelo índice de inibição do crescimento de promastigota (IP), dado pela quantidade de absorbância dos parasitos tratados com extratos, em comparação ao controle negativo.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA

Células peritoniais ( $1 \times 10^5$  macrófago/poço) foram adicionadas em tubos Eppendorfs e incubadas em atmosfera úmida ( $37^\circ\text{C}/3\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar) juntamente com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ( $5 \times 10^5$  parasitos/poço) em uma proporção de 5:1 (macrófago/promastigota). Após a infecção dos macrófagos, estes foram incubados ( $37^\circ\text{C}/24\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar) em presença dos extratos vegetais (1 mg/mL). Após incubação, um volume de 100  $\mu\text{L}$  foi retirado da cultura e adicionado em lâminas para centrifugação em Cytospin (Fanem, São Paulo) por 5 min a 500 rpm. Essas lâminas foram, então, fixadas com metanol absoluto (Cromato Produtos Químicos Ltda.) para coloração com corante Giemsa e posterior análise microscópica. O número de amastigota intracelular foi determinado pela contagem de amastigotas em 100 macrófagos infectados por amostra e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle negativo, poço contendo apenas células e meio RPMI<sup>7,24</sup>.

#### AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Células esplênicas ( $4 \times 10^6$  células/poço) foram distribuídas em placa de 96 cavidades e incubadas ( $37^\circ\text{C}/36\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar) com concanavalina A (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e extratos de *C. laurifolia* (0,1 mg/mL). Após incubação foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de  $^3\text{H}$ -timidina (1  $\mu\text{Ci}$ ), sucedendo nova incubação ( $37^\circ\text{C}/12\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar). As células foram então coletadas em membranas de fibra de vidro e submetidas à leitura em um contador de radiação  $\beta^{15}$ . O percentual de inibição

da linfoproliferação foi dado por um índice da inibição da incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina em culturas de células estimuladas com ConA na presença dos extratos, com as células cultivadas apenas em presença dos extratos.

#### AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos peritoniais ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram distribuídos em placa de cultura de 96 cavidades para posterior incubação em atmosfera úmida ( $37^\circ\text{C}/2\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar). Após a remoção das células não aderidas, foram adicionados à cultura LPS (Sigma, EUA) (Lipopolysaccharides *Escherichia coli* 0111:B4) (500 ng/mL), IFN- $\gamma$  (5 ng/mL) e extratos de *C. laurifolia* (0,1 mg/mL). O controle negativo consistiu de células aderidas, RPMI completo, LPS (500 ng/mL) e IFN- $\gamma$  (5 ng/mL), e o positivo apenas de células aderidas e RPMI completo. Sucedeu-se a incubação ( $37^\circ\text{C}/24\text{ h}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 95% ar). Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram aspirados e a dosagem de ON produzido, foi feita de acordo com o método de Griess<sup>5</sup>. O percentual de inibição foi dado por um índice de inibição da produção de óxido nítrico das células tratadas com extrato, em comparação à produção de óxido nítrico das células não tratadas com extrato.

#### ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR / SCREENING FITOQUÍMICO

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  a 300 MHz foram registrados em espectrômetro modelo Mercury 300/Varian (DQ-UFPA), e a 500 MHz em espectrômetro modelo DRX500/Bruker (CENAUREN-DQ-UFPA). Para a realização da análise fitoquímica foi preparada uma solução padrão com o extrato liofilizado das sementes. Cerca de 5 g do extrato foram transferidos para um Becker e dissolvidos em 30 mL de álcool a 80%. A solução obtida foi levada ao banho-maria por 30 min e filtrada sob pressão. Com a solução resultante foram feitos testes químicos para verificar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, esteróides, triterpenóides, antraquinona.

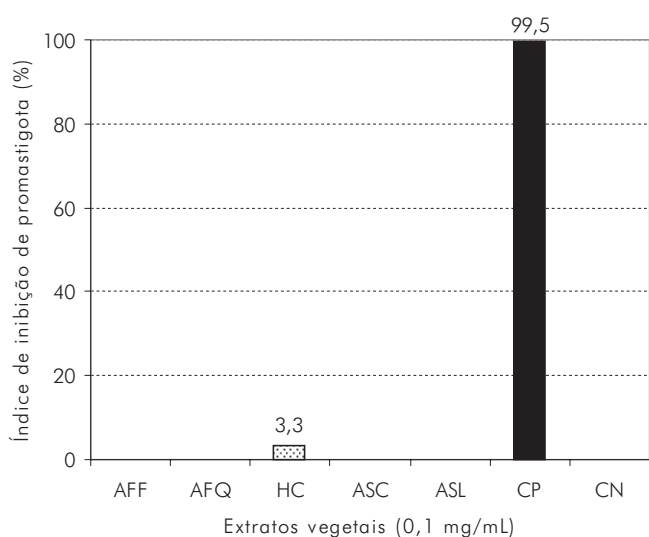
#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados com o auxílio do programa GraphPad InStat (ANOVA).

## RESULTADOS

Nos ensaios biológicos, nenhum dos extratos de *C. laurifolia* foi citotóxico na concentração 0,1 mg/mL, variando entre 0,6% (HC) a 14,4% (AQF), e inferiores ao índice considerado positivo para citotoxicidade (30%), bem como ao controle saponina ( $p < 0,01$ ) (dados não apresentados). Apesar desta concentração ter sido padronizada para quase todos os ensaios, a concentração 1 mg/mL foi posteriormente avaliada, e utilizada para investigar atividade anti-amastigota intracelulares. Porém, mesmo nesta concentração dez vezes maior em relação à primeira os índices de citotoxicidade variaram entre 0% (AQF, AFF) e 3,8% (HC), o que sugere a ausência de

atividade tóxica sobre macrófagos, mesmo quando usadas altas concentrações dos extratos. Todos os extratos revelaram, também, baixos índices de citotóxicos, tanto para as formas promastigotas (<3.3%) (Figura 1) quanto para as amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* (<20%) (Figura 2). Baixos índices também foram observados para a inibição da produção de ON em macrófagos ativadas, pois os percentuais variaram de 14% (extrato aquoso da semente produzido no laboratório) a 23% (extrato hidroalcoólico da casca), diferindo significativamente do controle negativo, células que não receberam tratamento (Figura 3). No entanto, esses extratos inibiram significativamente a proliferação de células esplênicas isoladas de camundongos BALB/c cultivadas com concanavalina A. Este efeito inibitório da linfoproliferação foi mais evidente no extrato ASC, chegando a 86% (Figura 4A), e observado em menor escala nos demais extratos (33,8% a 38,5%) quando avaliados na concentração de 0,1 mg/mL. Já o extrato ASL apresentou índices de inibição semelhantes ao ASC apenas quando testado em uma concentração dez vezes maior (1 mg/mL) (Figura 4B).

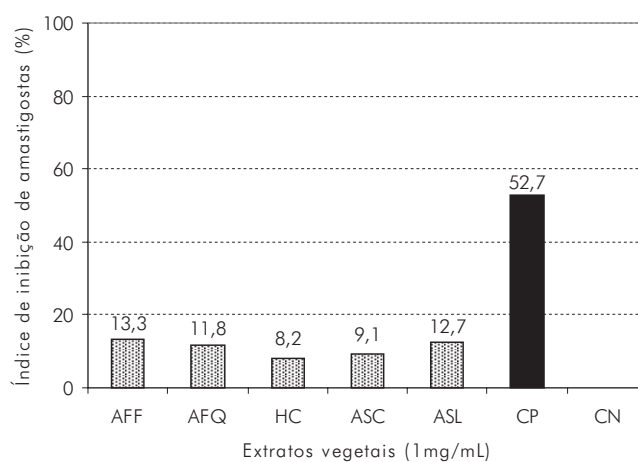


**Figura 1** – Efeito leishmanicida dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cultivados na presença dos extratos da planta (0,1 mg/mL): aquoso a frio da folha (AFF), aquoso a quente da folha (AQF), hidroalcoólico da casca (HC), aquoso da semente produzido pela comunidade (ASC) e aquoso da semente produzido no laboratório (ASL). Como controles negativo e positivo, respectivamente, meio de cultura (CN) e anfotericina B a 0,025 mg/mL (CP). O índice de inibição de promastigotas expressa, em porcentagem, a razão entre promastigotas viáveis\* tratadas e não tratadas com extrato teste. Diferença entre o controle positivo e os demais tratamentos ( $p < 0,001$ )

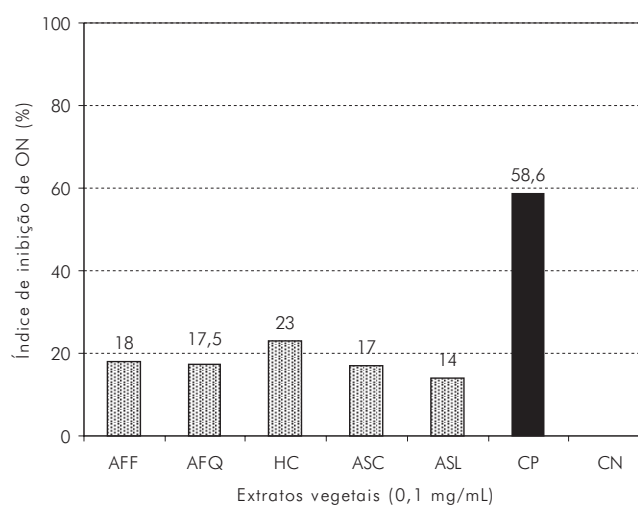
\* Metabolização de MTT.

† Análise microscópica de amostra corada pelo Giemsa.

‡ Método de Griess.

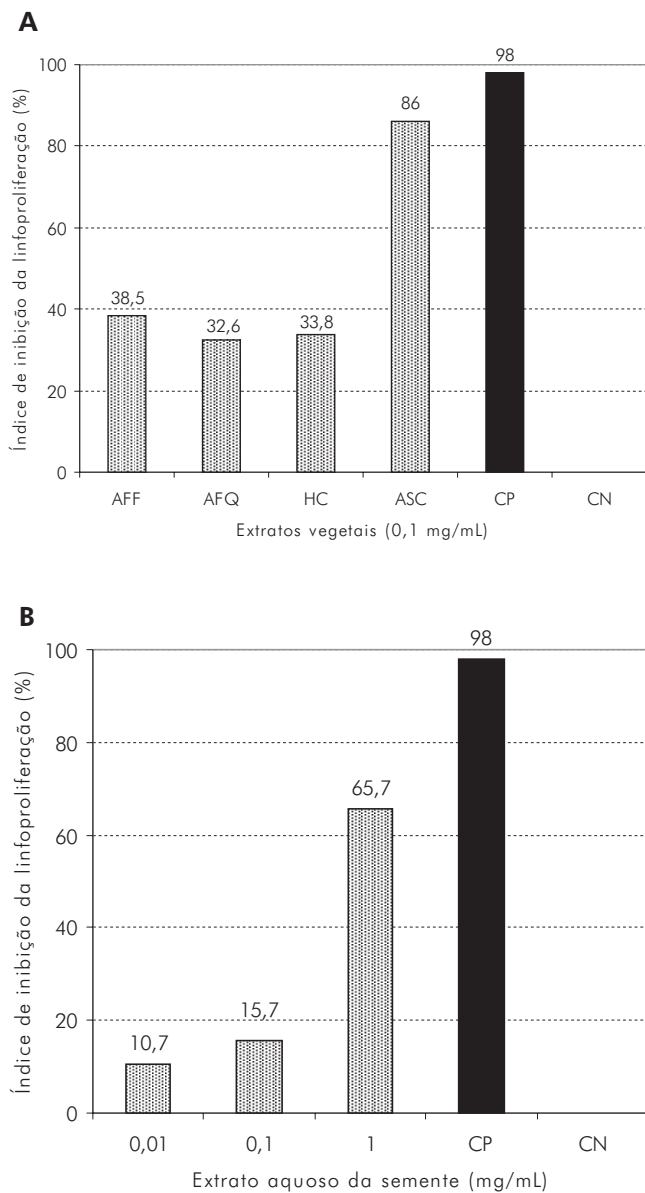


**Figura 2** – Efeito leishmanicida dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. sobre formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Macrófagos peritoneais (MØ) de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e cultivados na presença dos extratos da planta (1 mg/mL): aquoso a frio da folha (AFF), aquoso a quente da folha (AQF), hidroalcoólico da casca (HC), aquoso da semente produzido pela comunidade (ASC) e aquoso da semente produzido no laboratório (ASL). Como controles negativo e positivo, respectivamente, meio de cultura (CN) e anfotericina B a 0,025 mg/mL (CP). O índice de inibição de amastigotas expressa, em porcentagem, a razão entre o número de amastigotas† infectando macrófagos tratados e não tratados com extrato teste. Houve diferença entre o controle positivo e os demais tratamentos ( $p < 0,05$ )



**Figura 3** – Efeito dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos ativadas. Macrófagos peritoneais (MØ) de camundongos BALB/c cultivados em presença de LPS (500 ng/mL) e IFN- $\gamma$  (5 ng/mL) e dos extratos da planta: **A** – aquoso a frio da folha (AFF), aquoso a quente da folha (AQF), hidroalcoólico da casca (HC) e aquoso da semente produzido pela comunidade (ASC) na concentração de 0,1 mg/mL e **B** – aquoso da semente produzido no laboratório (ASL) nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 mg/mL. Como controles negativo e positivo, respectivamente, meio de cultura com LPS e IFN- $\gamma$  (CN) e meio de cultura (CP). O índice de inibição da produção de óxido nítrico expressa, em porcentagem, a razão entre níveis de ON‡ produzido pelas células tratadas e não tratadas com o extrato teste. Diferença entre o controle positivo e os demais tratamentos ( $p < 0,001$ )





**Figura 4** – Efeito dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. sobre a linfoproliferação celular. Esplenócitos de camundongos BALB/c cultivadas em presença de mitógeno (ConA; 0,001 mg/mL) e do extrato: **A** – aquoso a frio da folha (AFF), aquoso a quente da folha (AQF), hidroalcolico da casca (HC) e aquoso da semente produzido pela comunidade (ASC) nas concentrações de 0,1 mg/mL; **B** – extrato aquoso da semente produzido no laboratório (ASL) nas concentrações de 0,1; 0,01 e 0,001 mg/mL. Como controles negativo e positivo, respectivamente, meio de cultura com mitógeno (CN) e meio de cultura (CP). O índice de inibição da linfoproliferação expressa, em porcentagem, a razão entre células viáveis<sup>§</sup> tratadas e não tratadas com diluição teste do extrato. Diferença entre o controle positivo e os demais tratamentos ( $p < 0,001$ )

No sentido de verificar se havia diferenças químicas entre os extratos ASC e ASL, que justificassem atividades biológicas diferenciadas, cromatogramas e espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram observados. Nesta análise química preliminar foi constatado que tanto as diferenças físicas entre o extrato ASC (marrom e granuloso) e o ASL (branco e com aspecto de um pó fino) quanto as suas atividades biológicas, podem ter decorrido do desaparecimento de substâncias polares, de acordo com o cromatograma e espectro de RMN  $^1\text{H}$  do extrato ASC (dados não apresentados), ocorrido durante a eliminação do solvente.

## DISCUSSÃO

Em um levantamento etnobotânico realizado na comunidade de Arancuã, Belém e Menezes<sup>3</sup> identificaram 12 espécies vegetais utilizadas pela comunidade para o tratamento de LC, sendo que *C. laurifolia* foi a que recebeu maior número de indicações. Associando a essa indicação popular e à carência de estudos químicos e biológicos, *C. laurifolia* foi selecionada neste trabalho para avaliação da atividade anti-*Leishmania* e imunomodulação e análise química preliminar dos extratos bioativos. Extratos de diversas partes da planta foram obtidos no laboratório, e utilizou-se, também, um extrato aquoso da semente produzido por um curandeiro da comunidade (ASC).

Com relação à atividade anti-*Leishmania*, todos os extratos testados apresentaram baixos índices de citotoxicidade, tanto para as formas promastigotas quanto para amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Baixos índices de inibição de ON também foram observados em todos os extratos, porém, o extrato das sementes se revelou potente imunossupressor sendo o ASC em maior potencial (0,1 mg/mL) (Figura 4A e 4B).

Para avaliar as diferenças biológicas entre os dois modos de preparo (ASL e ASC), o pó (usado de forma tópica), resultante da extração aquosa das sementes – remédio mais utilizado pelos quilombolas para o tratamento das lesões de LC – foi submetido a um estudo fitoquímico preliminar. Porém, chamou atenção o fato de esses dois extratos apresentarem diferenças físicas bem evidentes, isto é, cores e granulidade diferentes, sugerindo uma provável distinção química entre eles. Especulou-se que tais transformações seriam consequência, principalmente, de reações fotoquímicas ocorridas com extrato ASC (exposição ao sol) durante a eliminação do solvente, pois observando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  algumas substâncias polares presentes neste extrato não foram evidenciadas no ASL (dados não apresentados). A produção em menor quantidade de tais substâncias polares pode ter reduzido significativamente o potencial imunossupressor do ASL em comparação ao ASC (0,1 mg/mL).

<sup>§</sup> Incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina.

Em geral, a mensuração da imunossupressão baseia-se na detecção do crescimento celular resultante de uma ativação ou de condições da cultura, sendo que a inibição pode ocorrer quando as células têm seus fatores de crescimento suprimidos, ou quando há indução de energia ou apoptose celulares<sup>15</sup>. Como os extratos de *C. laurifolia* apresentam baixa citotoxicidade, é provável que sua ação seja sobre os mediadores deste crescimento, e não pela indução de morte celular, como foi o caso de frações alcalóides de *Boerhavia diffusa* L., Nitaginaceae<sup>17</sup>. Além disso, o percentual de inibição da linfoproliferação do extrato aquoso da semente (86%) não foi estatisticamente diferente do valor encontrado nas células cultivadas na ausência de estímulo mitogênico (98%), o controle positivo.

Esta atividade de inibição da linfoproliferação foi observada também em extrato aquoso de *Osbeckia aspera* L. (Melastomaceae), planta usada tradicionalmente por indígenas para o tratamento de doenças do fígado. Ele confere proteção contra hepatotoxicidade, pois provavelmente a inibição do número de células leve a uma diminuição dos níveis de inflamação<sup>18</sup>. Esta correlação foi feita também por Punzon<sup>19</sup> que utilizou extratos hidrometanólicos de *Phlebodium decumanum* Willd. (Polypodiaceae), demonstrando que a inibição do crescimento celular foi acompanhada pela diminuição dos níveis de IL-1 e TNF. A redução da atividade biológica dessas citocinas pode levar à diminuição dos fatores que controlam genes pró-inflamatórios e de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), sendo considerados interessantes como agentes anti-inflamatórios, principalmente para o tratamento de artrite reumatóide. Outras espécies, como *Embrica officinalis* (Euphorbiaceae) e *Evolvulus alsinoides* L. (Leguminosae), apresentam atividades imunossupressoras associadas à diminuição das agressões foliculares de linfócitos em inflamações induzidas por adjuvantes de artrite reumatóide em modelos murinos<sup>11</sup>.

Todavia, independentemente do modo de ação das drogas, a inibição da proliferação celular parece estar associada a uma atividade anti-inflamatória, pois a redução do crescimento celular implica em diminuição de receptores solúveis produzidos por estas células e de proteases que convertem precursores inativos em ativos<sup>19</sup>.

Pelo fato de as lesões cutâneas causadas por *Leishmania* spp., nas fases iniciais da infecção, envolverem reações inflamatórias, com participação de linfócitos, plasma celular, macrófagos e, em muitos casos, reações granulomatosas<sup>16,13</sup>, drogas com potencial anti-inflamatório podem ajudar na cicatrização das lesões. Tal

fato corrobora a indicação quilombola de *C. laurifolia* para o tratamento de LCA, pois o seu uso pode não estar associado majoritariamente com uma ação direta sobre o parasito, mas sim com uma atividade anti-inflamatória importante, que diminui os danos teciduais causados pelo sistema imune em resposta à infecção.

Esta ação anti-inflamatória *in vivo*, talvez seja intensificada pelo fato dos extratos de *C. laurifolia* apresentarem um pequeno potencial de inibição da produção de ON em macrófagos ativadas (Figura 3), pois altos níveis desse metabólito, que deveria ser tóxico apenas para microorganismos, parasitos ou células tumorais, podem também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes<sup>11,8,14,25</sup>. Vale a pena ressaltar a importância da observação do modo de preparo do extrato vegetal, pois a atividade descrita por um grupo étnico pode estar associada ao modo particular de sua obtenção, como é o caso do extrato ASC que apresenta sua atividade potencializada atribuída, provavelmente, à maneira pela qual a comunidade faz a eliminação do solvente (exposição ao sol<sup>12</sup>) e o tipo de solvente (água do rio – rica em matéria orgânica e ácidos húmicos<sup>24</sup>). Outros ensaios são requeridos, principalmente utilizando frações isoladas do extrato ASC e ASL no sentido de elucidar uma ou mais substâncias supostamente envolvidas na atividade imunossupressora desse vegetal.

## CONCLUSÃO

Atividade anti-*Leishmania* não foi evidenciada em nenhum dos extratos de *C. laurifolia*. Porém, os extratos da semente, em maior evidência no extrato produzido pela comunidade (ASC), apresentam satisfatório potencial imunossupressor. No entanto, frações purificadas desses extratos devem ser avaliadas, principalmente polares, com o objetivo de verificar o potencial imunomodulador e anti-inflamatório dessa espécie.

## AGRADECIMENTOS

A doutora Elisabeth van den Berg, botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, pela identificação taxonômica da espécie vegetal em estudo. Aos mestres José Fernando Oliveira e Matheus do Santos de Sá do Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, pela colaboração na realização dos ensaios biológicos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Prefeitura Municipal de Oriximiná pelo apoio logístico nas viagens de campo.



## Anti-Leishmania and immunomodulatory potential of extracts of *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae)

### ABSTRACT

Infusions of leaves, bark and seeds of *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae) are used by communities of African-American descendants of slaves (*quilombolas*) mainly for treatment of cutaneous leishmaniasis (CL), wounds, ulcers and tinea. Hydroalcoholic and aqueous extracts of *C. laurifolia* were investigated for anti-*Leishmania* activity on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* and immunomodulatory responses, including cell proliferation of splenocytes and NO production by peritoneal macrophages from BALB/c mice. The hydroalcoholic extracts of the bark and the aqueous extracts of the leaves and seeds presented a reduced activity against amastigotes and promastigotes (<20%), and the same result was observed for the inhibition of NO production by activated macrophages (<23%). Most of the extracts displayed a moderate immunosuppressive potential (32.6 to 38.5%); on the other hand, the aqueous extracts of seeds inhibited up to 87% of the growth of splenocytes of BALB/c mice stimulated with mitogens. Such activity may explain the use of *C. laurifolia* for the treatment of CL by *quilombolas*. Its use may not be mainly associated with a direct action on the parasite but with an anti-inflammatory activity because such activity decreases the tissue damage caused by the immune system in response to the infection and, consequently, aids the healing process of leishmanial lesions.

**Keywords:** Phytotherapy; Plant Extracts; Fabaceae; Leishmaniasis; Immunosuppression.

## Potencial anti-Leishmania y inmunomodulador de extracto de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae)

### RESUMEN

Las infusiones de las hojas, cortezas y semillas de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae) son utilizadas por las comunidades de descendientes de esclavos negros (denominados *quilombos*) para el tratamiento, principalmente, de la leishmaniasis cutánea (LC), de heridas en la piel, de úlceras e impétigo. Se investigó con extractos hidroalcohólicos y acuosos de *C. laurifolia* la actividad anti-*Leishmania* en promastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis* y la respuesta inmunomoduladora: proliferación celular de esplenocitos y producción de ON por macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. Los extractos hidroalcohólicos de la corteza y acuosos de la hoja y de la semilla presentaron una menor actividad frente a las formas de amastigotes y promastigotes (<20%) y el mismo se observó para la inhibición de la producción de ON por los macrófagos activados (<23%). La mayoría de los extractos presentaron un moderado potencial inmunosupresor (de 32,6% a 38,5%), pero los extractos acuosos de la semilla (AS) inhiben hasta un 87% el crecimiento de esplenocitos BALB/c estimulados con mitógenos. Esa actividad puede explicar la indicación de los descendientes de *quilombos* (*quilombolas*) del uso de *C. laurifolia* para el tratamiento de LC, ya que su uso puede no estar asociado principalmente con una acción directa sobre el parásito, sino con una actividad inflamatoria, pues esa actividad disminuye el daño tisular causado por el sistema inmunológico en respuesta a la infección y, en consecuencia, ayuda en la cicatrización de las lesiones ocasionadas por la leishmaniasis.

**Palabras clave:** Fitoterapia; Extractos Vegetales; Fabaceae; Leishmaniasis; Inmunosupresión.



### REFERÊNCIAS

- 1 Acevedo R, Castro E. Negros do Trombetas: guardiães de matas e dos rios. 2. ed. Belém: CEJUP; 1998. 98 p.
- 2 Akendengue B, Ngou-Milana E, Laurens A, Hocquemiller R. Recent advances in the against leishmaniasis with natural products. Parasite. 1999 Mar;6(1):3-8.
- 3 Belém HRF, Menezes CCS. As terapias tradicionais dos quilombolas de Arancuã [monografia]. Belém: Centro Universitário do Pará, Departamento de Farmácia; 2003.
- 4 Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep 2001 Dec;18(6):674-88.
- 5 Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Seo JK, Jeong HG. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from murine macrophages. Int Immunopharmacol. 2001 Jun;1(6):1141-51.
- 6 Damre AS, Gokhale AB, Phadke AS, Kulkarni KR, Saraf MN. Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. Fitoterapia. 2003 Apr;74(3):257-61.
- 7 Delorenzi CJ, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AC, et al. Antileishmania activity of Indole alkaloids from *Peschiera australis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May;45(5):1349-54.

- 8 Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade: metabolismo, síntese e função. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):265-71.
- 9 Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R, Cave A. 2-Substituted quiloline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Apr;37(4):859-63.
- 10 Fournet A, Ferreira ME, Arias AR, Ortiz ST, Fuents S, Nakayama H, et al. *In vivo* efficacy of oral end intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Nov;40(11):2447-51.
- 11 Ganju L, Karan D, Chanda S, Srivastava KK, Sawhney RC, Selvamurthy W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomed Pharmacother.* 2003 Sep;57(7):296-300.
- 12 Goradio AC. Modelos clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura química e atividade biológica. *Quim Nova.* 1996;9(3):278-89.
- 13 Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000 Jul;25(5):363-70.
- 14 Ignácio SRN, Ferreira JLP, Almeida MB, Kubelka CF. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. *J Ethnopharmacol.* 2001 Feb;74(2):181-7.
- 15 Kaufmann SHE, Kabelitz D. Immunology of infection: methods in microbiology. New York: Academic Press; 1998.
- 16 Machado P, Araújo C, Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira A Jr, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of ulcer. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun;34(12):69-73.
- 17 Mungantiwar AA, Nair AM, Shinde UA, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, et al. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. *J Ethnopharmacol.* 1999 May;65(2):125-31.
- 18 Nichol DS, Daniels HM, Thabrew MI, Grayer RJ, Simmonos MSJ, Hughes RD. *In vitro* studies on the immunomodulatory effects of extracts of *Osbeckia aspera*. *J Ethnopharmacol.* 2001 Nov;78(1):39-44.
- 19 Punzon C, Alcaide A, Fresno M. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *Int Immunopharmacol.* 2003 Set;3(9):1293-9.
- 20 Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Science, medicine, and the future: leishmaniasis. *BMJ.* 2000 Sep;321(7264):801-4.
- 21 Sampaio RNR, Takano GHS, Malacarne ACB, Pereira TR, Magalhães AV. Ineficácia *in vivo* da terbinafina em leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 jul-ago;36(4):531-3.
- 22 Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meireiles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2'6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 May;43(5):1234-41.
- 23 Tropical Plant Database. *Campsiandra laurifolia* [Internet] Carson: Raintree Nutrition. 1996. [citado 2009 set 16]. Disponível em: <http://www.rain-tree.com/Campsiandra.htm>.
- 24 Van Rensburg CE, Naude PJ. Potassium humate inhibits complement activation and the production of inflammatory cytokines *in vitro*. *Inflammation.* 2009 Aug;32(4):270-6.
- 25 Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S. Inhibitors of Nitric Production from Hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull.* 2003 Jan;26:61-5.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2009  
 Aceito em / Accepted / Aceito en: 25/9/2009