



# Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*

Karla Katiúcia Alves Santos<sup>1</sup>; Miriam Rolón<sup>2</sup>; Celeste Vega<sup>2</sup>; Antonieta Rojas de Arias<sup>2</sup>; José Galberto Martins da Costa<sup>3</sup>; Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

<sup>2</sup>Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill, Asunción-Paraguay.

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitas pode ser encontrada na Região Amazônica. Revisões recentes na quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. Foram preparados extratos etanólicos das folhas de *E. uniflora* e *M. charantia*. Para os testes *in vitro* de *Leishmania brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. Nossos resultados indicam que *E. uniflora* foi eficaz contra a cepa de parasita testada, representando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *L. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** *Eugenia uniflora*. *Momordica charantia*. *Leishmania brasiliensis*. Atividade citotóxica. Promastigotas.

## INTRODUÇÃO

Leishmaniose tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade dermatotrópica de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitas pode ser encontrada na Região Amazônica (Rangel & Lainson, 2009). Recentemente, revisões na quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos (Croft et al., 2005; 2006).

A transmissão dos agentes causais envolve diferentes espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodimalian:

Phlebotominae) em estreita relação com hospedeiros mamíferos dos parasitas, com a consequente formação de um número de ciclos de transmissão diferentes em todo país (Rangel & Lainson, 2009). A Leishmaniose apresenta diversas e complexas manifestações clínicas (Desjeux, 2004).

A avaliação da toxicidade de substâncias bioativas é um dos primeiros passos para a utilização destas substâncias em modelos animais. Atualmente, os fármacos utilizados para parasitas como *L. brasiliensis* mostra uma alta toxicidade porque metabólitos produzidos afetam tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade (Dias & Desso, 2009).

*Eugenia uniflora* (Myrtaceae) é muito utilizada como alimento e na medicina tradicional, devido as suas propriedades biológicas (Holetz et al., 2002; Sharma et al., 2006). Conhecida no Brasil como pitanga, tem sido bem estudada devido ao seu potencial como um antioxidante (Velazquez et al., 2003), hipotensivo (Consolini & Sarubbio, 2002), fotossensibilizador e potencializador de antibiótico (Coutinho et al., 2010a; 2010b). Vários constituintes de *E. uniflora* foram isolados, como os flavonóides miricitrina, quercetina e quercetina-3-O-ramnosídeo, além de esteróides, monoterpenos, triterpenos, taninos, antraquinonas, fenóis, cineol e óleos essenciais (Bandoni et al., 1972; Wazlawik et al., 1997).

*Momordica charantia* (Cucurbitaceae), é uma erva conhecida popularmente no Brasil como “melão-de-São-Caetano”. Esta planta é comumente encontrada em outras áreas tropicais da Ásia, América e África. Vários flavonóides com atividades farmacológicas e biológicas têm sido identificados em *M. charantia* (Grover & Yadav, 2004; Coutinho et al., 2009a; 2010b). *M. charantia*, tem sido muito estudada devido ao seu potencial como um antioxidante (Coutinho et al., 2010b), antimicrobiano (Roopashree et al., 2008; Faria et al., 2009), antidiabético, antilipêmico (Fernandes et al., 2007), imunomodulador (Juvekar et al., 2009) e antiinflamatório (Umukoro & Ashorobi, 2006).

O Objetivo deste trabalho é avaliar a atividade leishmanicida e citotóxica dos extratos etanólicos das folhas de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*.

*Autor correspondente:* Henrique Douglas Melo Coutinho - Departamento de Química Biológica - Universidade Regional do Cariri - URCA - Crato-CE Brasil - Rua Cel. Antonio Luis 1161 - Pimenta - CEP.63105-000 - fone: +55(88)31021212 - fax +55(88) 31021291

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Folhas de *E. uniflora* e *M. charantia* foram coletadas na estação chuvosa, em abril de 2008, na cidade do Crato, estado do Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado pela Dra. Arlene Pessoa, e as exsiccatas foram depositadas com os números 3106 e 703, respectivamente, no Herbário “Dárdano de Andrade Lima” da Universidade Regional do Cariri – URCA.

### Preparação dos Extratos Etanólicos de *Eugenia uniflora* (EEEU) e *Momordica charantia* (EEMC)

Duzentos gramas de folhas de cada espécie foram secas em estufa a 104°C por 24h e pulverizadas em temperatura ambiente. O material pulverizado em moinho foi macerado utilizando 1L de etanol 95% em temperatura ambiente durante 72h. O extrato obtido foi filtrado e concentrado a pressão reduzida em evaporador rotatório a 60°C e 760mm/Hg (Brasileiro et al., 2006). O rendimento dos extratos obtidos variou entre cinco a seis gramas de cada extrato. Os extratos EEEU e EEMC foram diluídos em DMSO para realização dos testes.

### Linhagens celulares utilizadas

Culturas de *Leishmania braziliensis* foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay – IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *L. braziliensis* seguiram os procedimentos descritos por Roldos et al. (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivada a 22°C em meio Schneider's Drosophila, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem murina de fibroblastos NCTC929, obtida junto ao *National Collection of Type Cultures* e cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativado por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón et al., 2006).

### Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas até uma concentração de 10<sup>6</sup> células/mL e então 200 µL foram transferidas para o teste. Os extratos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações de 100 e 500 µg/mL e transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos extratos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com uma droga controle (metronidazol).

### Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em microplacas de 96 cavidades a uma concentração final de 3 x 10<sup>4</sup> células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Após isso, o meio de cultura foi removido e 200 µL dos extratos misturados com o meio de cultura nas concentrações do teste foram adicionados, sendo realizado um novo cultivo por 24h. Após esta incubação, 20 µL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorvância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

## RESULTADOS

Os resultados são mostrados na tabela 1. Na avaliação da atividade leishmanicida, os dois extratos foram ativos na concentração de 500 µg/mL, já na concentração de 100 µg/mL *M. charantia* não apresentou atividade, entretanto *E. uniflora* teve uma atividade inibitória superior a 50%. EEEU e EEMC apresentaram níveis elevados de citotoxicidade nas concentrações testadas.

Tabela 1: Atividade leishmanicida e potencial citotóxico dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*.

Extracts	Concentração (µg/mL)	Citotoxicidade (%)	Atividade Leishmanicida (%)
EEEU	500	77	75
	100	76	65
EEMC	500	77	60
	100	44	0
METRO	2	-	100
	1	-	97,9

EEEU- Extrato Etanólico de *Eugenia uniflora*; EEMC- Extrato Etanólico de *Momordica charantia*; METRO – Metronidazol.

## DISCUSSÃO

A estratégia de pesquisa por novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias passa por ensaios *in vitro* e *in vivo* que são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), um candidato a fármaco deve ser submetido a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiparasitária. Realizada essa primeira triagem, os resultados são analisados para definir a possibilidade de ensaios *in vivo* (Dias & Dessoy, 2009).

O EEEU apresentou um relevante potencial leishmanicida, pois inibiu 65% do crescimento da cepa testada a uma concentração de 100 µg/mL. Este é o primeiro relato de atividade de *E. uniflora* contra *L. braziliensis*. *E. uniflora* já foi testada quanto ao seu potencial leishmanicida, segundo Braga et al. (2007) o extrato metanólico de *E. uniflora*, assim como o de *Syzygium cumini* (outra planta da família Myrtaceae) foram inativos contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Ambos apresentaram uma IC<sub>50</sub> superior a 250 µg/mL.

Estudos realizados por Gupta et al. (2010) demonstraram que os frutos de *M. charantia* representam

uma nova alternativa no tratamento de Leishmaniose, um componente purificado a partir destes frutos que foi denominado momordicatina apresentou uma IC<sub>50</sub> de 0,02 mg/mL, dado muito importante já que esta IC<sub>50</sub> foi melhor que fármacos antileishmania.

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade leishmanicida é a avaliação de sua toxicidade em células do hospedeiro. A atividade citotóxica de outras plantas foi avaliada em diferentes modelos de células humanas, tais como: linfócitos humanos (Reyes-Chilpa et al., 2008), células MRC-5 (Cabral et al., 2010) e macrófagos peritoneais (Houghton et al., 2007).

Nossos resultados indicam que *E. uniflora* foi consideravelmente eficaz contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *L. brasiliensis*. Em se tratando da citotoxicidade novos testes devem ser realizados já que os níveis foram elevados, viabilizando futuros ensaios *in vivo*.

## ABSTRACT

*Antileishmanial in vitro activity of Eugenia uniflora and Momordica charantia*

**Cutaneous leishmaniasis is caused in Brazil by several species of the genus *Leishmania* and a wide variety of these protozoan parasites can be found in Brazil, mainly in the Amazon region. Recent reviews on the chemotherapy of leishmaniasis show the low effectiveness of the usual therapeutic agents, demonstrating the need for new drugs. An interesting possible alternative to the conventional drugs is offered by natural products extracted from *Eugenia uniflora* and *Momordica charantia*. Ethanol extracts were prepared from the leaves of *Eugenia uniflora* and *Momordica charantia* and assayed *in vitro* against *Leishmania brasiliensis* promastigotes and fibroblasts to assess their antileishmanial and cytotoxic activities, respectively. Our results indicate that *E. uniflora* was active against the parasitic forms of *L. brasiliensis*.**

**Keywords:** *Eugenia uniflora*. *Momordica charantia*. *Leishmania brasiliensis*. Cytotoxic activity. Promastigotes.

## REFERÊNCIAS

- Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia*. 1972;35(1): 69-80.
- Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmania and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;111(2):396-402.
- Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Cienc Farm*. 2006;42(2):195-202.
- Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves COM, Braga MV, Souza W, Soares RO. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2010;124(3):319-24. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.11.007.
- Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol*. 2002;81(1):57-63.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010;33(6):467-71. DOI: 10.1016/j.cimid.2009.08.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Jr JP. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. *Pharma Biol*. 2009b; 47(11):1056-1059. DOI:10.3109/13880200902991540
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. *J Med Food*. 2010;13(4):1024-6. DOI: 10.1089/jmf.2009.0158.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP, Lima EO. *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. *Rev Bras Bioci*. 2010b;8(3):299-301.
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2005;21(11):508-512.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):111-126.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305-318.
- Dias LC, Dessoy MA. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova*. 2009;32(9):2444-2457.
- Faria FA, Bueno CJ, Papa MFS. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Acta Scientiarum Agr*. 2009;31(3):383-389.
- Fernandes NPC, Lagishetty CV, Panda VS, Naik SR. An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized *Momordica charantia* fruit extract. *BMC Complement Altern Med*. 2007;7:1-8.
- Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*. 2004;93(1):123-132.
- Gupta S, Raychaudhuri B, Banerjee S, Das B, Mukhopadhaya S, Datta SC. Momordicatin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. *Parasitol Int*. 2010;59(2):192-7. DOI: 10.1016/j.parint.2010.01.004.

- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(7):1027-31.
- Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. J Ethnopharmacol. 2007;110(3):391-400. .
- Juvekar AR, Hule AK, Sakat SS, Chaugule VA. *In vitro* and *in vivo* evaluation of immunomodulatory activity of methanol extract of *Momordica charantia* fruits. Drug Inv Today. 2009;1:89-94.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):937-954.
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):431-6.
- Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, Veja C, Marrero-Ponce Y, Huguaburu V, Yaluff G, Gómez-Barrio A, Sanabria L, Ferreira ME, Arias AR, Pandolfi E. Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. Eur J Med Chem. 2008;43(9):1797-807. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.11.007.
- Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, Malpartida F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents. 2006;28(2):104-9.
- Roopashree TS, Dang R, Shobha Rani RH, Narendra C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. Int J Appl Res Nat Prod. 2008;1(3): 20-28.
- Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. J Ethnopharmacol. 2006;104(3):367-73.
- Umukoro S, Ashorobi RB. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. Afr J Biomed Res. 2006;9(2):119 -124.
- Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich De Buschiazzo P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia. 2003;74(1-2):91-7.
- Wazlawik E, Silva MA, Peters RR, Correia JF, Farias MR, Calixto JB, Ribeiro-Do-Valle RM. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. J Pharm Pharmacol. 1997;49(4):433-7.

Recebido em 19 de maio de 2012

Aceito para publicação em 23 de julho de 2012