

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO E TRITERPENO LUPANO OBTIDOS DE COMBRETUM LEPROSUM CONTRA MICROORGANISMOS.

Érica Ribeiro de Lima¹
Leandro Soares Moreira²
Valdir Alves Facundo²
Izaltina Silva-Jardim³
Carolina Bioni Garcia Teles¹

RESUMO: Avaliou-se a atividade antimicrobiana, antileishmanicida e candidacida do extrato etanólico (EEFr) e triterpeno lupano obtidos dos frutos de *Combretum leprosum*. Para avaliar a atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em ágar, com 6 diferentes microrganismos. Para avaliação antileishmania contra promastigotas *L. amazonensis* foi realizada contagem durante 5 dias de cultura em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Os testes de difusão em Disco não obtiveram formação de halo para *P. aeruginosa* e *C. albicans*; halo inferior ou igual ao diluente (Etanol, 95%) para *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*; e halo superior ao diluente para *S. aureus* e *E. coli*. Estes dados significam que em tese o EEFr e triterpeno lupano fornecem parcialmente ou não uma ação antibactericida. Os resultados quanto à inibição de crescimento do parasita demonstraram que o EEFr apresentou efeito inibitório dose dependente atingindo inibição total do crescimento do parasita na concentração de 100µg/ml e o triterpeno é um potente inibidor apresentando um IC₈₀ de 5µg/ml.

PALAVRA-CHAVES: *Combretum leprosum*. Atividade antibactericida. Atividade antileishmania. Microorganismos.

ABSTRACT: It was evaluated antimicrobial, antileishmanicidal and candidacy activity of the etanolic extract (EEFr) and lupano triterpene gotten of the fruits of *Combretum leprosum*. To evaluate the antibactericidal activity the test of diffusion in agar was carried through, with 6 different microorganisms. For antileishmania evaluation against promastigotes *L. amazonensis* were carried through counting during 5 days of culture in chamber of Neubauer under optic microscope. The tests of diffusion in record had not gotten halo formation for *P. aeruginosa* and *C. albicans*; inferior or equal halo to diluent (Ethanol, 95%) for *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*; and superior halo to diluent for *S. aureus* and *E. coli*. These data mean that in thesis the EEFr and lupano triterpene supply partially or not an antibactericidal action. The results how much to the inhibition of growth of the parasite they had demonstrated that the EEFr presented inhibitory effect dependent dose reaching total inhibition of the growth of the parasite in the concentration of 100 µg/ml and the triterpene are a powerful inhibitor presenting a IC₅₀ of 3,3 µg/ml.

KEYWORDS: *Combretum leprosum*. Antimicrobial activity. Antileishmanicidal activity. Microorganisms.

INTRODUÇÃO

A partir do século XIX a humanidade se deparou diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais devido a descoberta

¹Autor do artigo, Biomédica, instituição de fomento: Faculdade São Lucas – Laboratório de Microbiologia, Porto Velho-RO. , e-mail: kaftizake@yahoo.com.br.

Orientadora: Bióloga, docente da Faculdade São Lucas. carbioni@yahoo.com.br.

²Co-autores do artigo, Químicos, instituição de fomento: Universidade Federal de Rondônia - Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais, Porto Velho – RO. leandrosoaresmoreira@gmail.com, vfacundo@unir.br.

³ Co-autora, Bióloga, instituição de fomento: Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia – IPEPATRO, Porto Velho. izaltina_jardim@yahoo.com.br

de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade biológica, muitas vezes já confirmadas pelo uso popular e comprovados cientificamente (MIGUEL & MIGUEL, 2004).

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos (KUMATE, 1997).

Neste contexto e decorrente do uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada. Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas (ELISABETSKY, 1987; BABU et al., 1997). Diversos vegetais têm sido utilizados com fins láticos e curativos de infecções, entre eles encontram-se aqueles que são objetos deste estudo. Atualmente muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana (MACHADO et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido a pobreza e a falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 70% a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais como um primeiro tratamento de saúde (CALIXTO, 2000).

No Brasil, aproximadamente 84% das drogas atualmente no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro. Assim, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais para o tratamento dos seus males (ELISABETSKY & WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999).

A literatura apresenta vários registros da utilização de plantas da família *Combretaceae* em medicina popular, especialmente na África e Índia. O gênero *Combretum* (*Combretaceae*), compreendendo 370 espécies, apresenta cerca de 10% de suas espécies citadas na literatura com uso etnofarmacológico principalmente no tratamento de doenças como câncer, lepra, febres tropicais e cólicas. A flora cearense possui algumas espécies representantes deste gênero, denominadas popularmente como mofumbos, destacando-se a larga dispersão de

Combretum leprosum (mofumbo branco), cujas cascas são utilizadas etnofarmacologicamente como cicatrizante. Várias investigações sobre a atividade antimicrobiana de compostos isolados presente nas folhas, nos ramos e nos frutos dos membros da família *Combretaceae* tem sido realizada nos últimos anos (BREYTENBAC & MALAN, 1989).

McGaw e colaboradores (2001) utilizando extratos de 20 espécies de *Combretum* mostraram que algumas dessas como *C. apiculatum*, *C. imberbe* e *C. molle* apresentam ação antiinflamatória; outras como *C. hereroense* e *C. paniculatum* possuem ação anti-helmintos e anti-schistosoma, respectivamente; e algumas são capazes de provocar danos no DNA de bactérias como é o caso dos extratos de *C. apiculatum*, *C. hereroense* e *C. mossambicense*.

Além disso, foi também demonstrado que a *C. erythrophyllum* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta atividade parece ser dependente de flavonóides encontrados nesta planta, entre eles destacam-se a apigenina, genkwanina, 5-hidroxi-7, 4-metoxiflavona, rhamnocitrina; kaempferol, quercetina-5,3-dimetiléter e rhamnazinae, entre outros (ALEXANDER et al., 1992; MARTINI & ELOFF, 1998; MARTINI et al., 2004).

É importante salientar que todos estes compostos apresentaram atividade significativa contra o *Vibrio colerae* e *Enterococcus faecalis*, com valores de mínima concentração inibitória (MIC) na faixa de 25-50 µg/ml (MARTINI et al., 2004). Os flavonóides isolados da *Combretum erythrophyllum* não são potencialmente tóxicos para as células humanas, com exceção do flavonóide 5-hidroxi-7,4-metoxi-flavona. Este composto é potencialmente tóxico para as células humanas e exibe restrita atividade antioxidante, enquanto que a rhamnocitrina e a rhamnazina apresentam intensa atividade antioxidante. Os flavonóides genkwanina, rhamnocitrina, quercetin-5,3-dimetiléter e rhamnazina apresentaram alta atividade antiinflamatória quando comparados com o ácido mefenâmico (controle positivo) (MARTINI et al., 2004).

Katerere et al. (2003) mostraram que quatro triterpenos pentacíclicos isolados das folhas da espécie *C. imberbe*, dos quais dois são novos glicosídeos derivados do ácido 1 α ,3 β ,23-trihidroxiolean-12-en-29-oico (ácido hidroximbérbico), também apresentaram atividade antibacteriana e, particularmente, o ácido imbérbico apresentou potente atividade contra o *Mycobacterium fortuitum* e *Staphylococcus aureus*.

Trabalhos fotoquímicos têm sido realizados com o *Combretum* e diferentes espécies do gênero, as quais possuem vários compostos químicos bioativos (MASIKA & AFOLAYAN, 2002). Alguns desses compostos são: cicloartano, damarano e oleananos tripernóides, flavonóides, dibenzils aromáticos, estilbenos, fenantrenos, lignanas e aminoácidos os quais são encontrados em várias espécies do gênero *Combretum* (CHOWDHURY & ISLAM, 2004). Estudos fitoquímicos realizados com o *Combretum leprosum* por Facundo et al. (1993) permitiram o isolamento e a identificação de um triterpeno ainda inédito na literatura que foi denominado de 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHP), além do ácido arjunólico. A estrutura química do TTHP foi também determinada através de cristalografia de raios-X, confirmado que se tratava de um triterpeno realmente inédito na literatura.

Embora haja pesquisas recentes avaliando o efeito de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Combretum* sobre diferentes microrganismos, ainda não existem relatos sobre a bioatividade de *C. leprosum* em relação a bactérias, leveduras e leishmanias. Diante disso, foi selecionado a espécie *C. leprosum* que se destaca na região nordeste do Brasil para esse estudos microbiológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção das substâncias utilizadas nesta pesquisa

Os materiais botânicos utilizados neste trabalho foram os frutos de *Combretum leprosum* Mart, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQPN) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho-RO. Os frutos de *C. leprosum* foram coletados em maio de 2001, no Município de Viçosa – Ceará. Sua identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Afrânio Gomes Fernandes do herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde se encontra depositada uma exsicata sob o número 12446. As técnicas de isolamento, purificação, preparação de derivados e determinações estruturais do triterpeno, foram realizadas de acordo com a literatura por Facundo et al. (1993).

2. Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Proteus mirabilis* (ATCC25933), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13883), e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10.231). Foi suspenso um inóculo de cada cepa bacteriana em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubados a 37°C em estufa.

Para os testes antileishmanicida os parasitas utilizados nesse trabalho foram formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8), cuja cultura original foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto, da Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

3. Concentrações das drogas analisadas

Para avaliar a viabilidade das bactérias e leveduras na presença dos produtos de *C. leprosum*, foram utilizadas diferentes concentrações do extrato etanólico (EEFr) (125, 250 e 500µg/ml) e do triterpeno (03, 06, 09, 15, 100, 200, 300, 400 e 500µg/ml) diluídos em etanol. Já para os testes contra promastigotas de leishmanias foi utilizado o extrato etanólico nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5µg/ml e do triterpeno em 1, 2 e 5µg/ml diluídos em etanol.

4. Meios de Cultura e Ensaios Antimicrobianos

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* da suspensão bacteriana em todos os testes foi o Caldo BHI (Brain Heart Infusion). Também foram utilizados meios identificadores e selecionadores das bactérias estudadas visando um crescimento adequado e de uma excelente classificação e quantificação, como: Agar Sal Monitol (ASM), Ágar Cled, Ágar Sangue e EMB.

Para o plaqueamento das suspensões bacterianas no teste de difusão em disco foi utilizado Ágar Muller Hinton (MH) em placas de Petri de 14 cm com 30 ml de MH, o qual é recomendado pela OMS para a realização das provas de sensibilidade, como os antibiogramas. Para os testes com *C. albicans* foi utilizado o Agar Saboraud. Foi utilizado o protocolo de difusão em disco para avaliar a atividade bactericida dos compostos isolados de *C. leprosum*:

- Teste de difusão em Disco – É um método qualitativo clássico para testar a suscetibilidade de patógenos a antibióticos, também denominado de Método de Kirby Bauer de difusão em placa, neste teste observa-se o crescimento do organismo (resistente a droga) ou a falta de crescimento (sensível a droga) frente a antibióticos testes (NCCLS, 2000).

Para análise microbiológica, culturas bacterianas desenvolvidas em BHI por 24 horas foram diluídas até obter-se uma suspensão bacteriana cuja turvação foi comparada a escala padrão nº 0,5 de MacFarland e foram semeadas na superfície de ágar MH. A seguir, discos de papel de filtro esterilizados (medindo 0,6mm) foram impregnados com as concentrações previamente estabelecidas do EEFr e triterpeno e foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado. Antes de incubar na estufa à 35°C por 24 horas, deixou-se a placa à 4°C por 15 min para garantir a difusão do EEFr e triterpeno no ágar. Após a incubação por 24 horas foram observados os halos de inibição das amostras bacterianas. Foi utilizado como controle positivo para bactérias o Imipenem 10mg e como controle negativo o solvente etanol na maior concentração (5% para testes com extrato e 10 e 50% para ensaios com triterpenos). Os diâmetros dos halos foram determinados em milímetros (mm) para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima, menor concentração capaz de inibir o crescimento de microrganismos).

5. Avaliação da viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* após a exposição ao extrato etanólico e triterpeno isolados dos frutos de *C. leprosum*.

Para avaliar a viabilidade das promastigotas na presença dos produtos de *C. leprosum*, inicialmente, 5×10^5 promastigotas/ml de *L. amazonensis* em início de fase estacionária de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1000xg por 10 min em PBS estéril. Após a lavagem, os parasitas foram distribuídos em placas de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com Soro Fetal bovino a 10% e incubados com diferentes concentrações do extrato etanólico (EEFr) e do triterpeno diluídos em etanol.

As amostras foram incubadas por cinco dias a 24°C e, diariamente, alíquotas das culturas eram diluídas em PBS gelado contendo o corante eritrosina B 0,04% (v/v) para contagem do número de parasitas na cultura. Os parasitas corados de

vermelho eram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis eram considerados vivos. O cálculo era feito considerando apenas o número de parasitas vivo. O controle para determinar a morte dos parasitas foi a Pentamidina (5µg/ml e 100µg/ml) e as culturas contendo o controle do solvente foram incubadas com álcool na maior concentração (1% para testes com extrato e 0,3% para ensaios com triterpenos). A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas contido em um ml de cultura (SILVA-JARDIM, 2001).

O cálculo foi realizado utilizando-se a fórmula: n° de parasitas = média dos quatro quadrantes x n° da diluição x 10^4

RESULTADOS

Os resultados referentes à média dos diâmetros dos halos em milímetros de cada microrganismo tratados com o EEFr e triterpeno podem ser observados na Tabela 1 e 2. Os testes de difusão em disco utilizando o triterpeno avaliados em triplicata, não obtiveram formação de halo para *Pseudomonas aeruginosa* e *Cândida albicans*; halo inferior ou igual ao diluente (etanol) para *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*; e halo superior ao diluente nas concentrações de 125 e 250 µg/ml para *Escherichia coli* (Figura 1) e nas concentrações de 125µg/ml *Staphylococcus aureus*. Nos testes em discos realizados com concentrações baixas do triterpeno (03, 06, 09, 15µg/ml) ocorreu resistência por parte dos organismos estudados.

Já o efeito do extrato etanólico sobre os diferentes microrganismos apresentou um maior espectro de ação com atividade nas concentrações de 125µg/ml sobre *P.mirabilis*, *E. coli*, *S. aureus* e *K. pneumoniae* e na concentração de 250µg/ml para *K. pneumoniae*. Estes dados fornecem resultados Sensíveis ou Resistentes aos microrganismos estudados, isto significa que em tese o EEFr e triterpeno 3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno isolados dos frutos de *C. leprosum* fornecem parcialmente ou não uma ação antibactericida.

Tabela 1: Leitura dos halos de inibição (mm) obtidos com as diferentes concentrações do extrato etanólico (EEFr) isolado dos frutos de *C. leprosum*.

Microrganismos	Etanol	125µg/ml	250µg/ml	500µg/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	10	12	10	6

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	12	16	12	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	12	10	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	12	10	8
<i>Cândida albicans</i>	R	R	R	R

* R = Resistente

Tabela 2: Leitura dos halos de inibição (mm) obtidos com as diferentes concentrações do triterpeno isolado dos frutos de *C. leprosum*.

Microrganismo	Etanol	125µg/ml	250µg/ml	500µg/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	12	8	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	12	16	14	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	12	10	10
<i>Cândida albicans</i>	R	R	R	R

* R = Resistente



Figura 1: Placas com discos contendo o extrato etanólico isolado de *C. leprosum* e o microrganismo-teste *E. coli* ATCC 25922.

Para avaliar o efeito do EEFr de *C. leprosum* sobre o crescimento de *L. amazonensis* *in vitro*, formas promastigotas foram tratadas com as concentrações de 12,5, 25, 50 e 100µg/ml. Foi possível observar, através da contagem diária em

câmara de Neubauer, que a concentração de 100 μ g/ml foi suficiente para promover a morte de 100% dos parasitas (Tabela 3). Esse resultado foi semelhante ao obtido pela Pentamidina, que é um medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose e que é capaz de matar todos os parasitas nesta concentração (SERENO & LEMESRE,1997).

O índice de inibição de crescimento médio (IC₅₀) do extrato, que corresponde à inibição do crescimento em aproximadamente 50% em relação ao grupo controle, foi estimado numa concentração de 12,5 μ g/ml, uma vez que inibiu 56,5% do crescimento dos parasitas no 5º dia de cultura. Já nas concentrações de 25 e 50 μ g/ml observou-se uma alta inibição de 80% e 92,7% respectivamente. Teles et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes aos nossos e comentam que as hidroxilas presentes nesse triterpeno estão associadas a ação da molécula contra esses parasitas. A porcentagem de álcool utilizada como solvente do extrato e também testada como controle nesse estudo, cerca de 1%, foi bem tolerável pelo parasita, apresentando pequena diferença significativa (inibição de 4%) quando comparada com o controle sem tratamento.

Tabela 3: Inibição de Crescimento obtidos em diferentes concentrações do EEFr dos frutos de *C. leprosum* contra *L. amazonensis* *in vitro* no quinto dia de cultura

Concentrações do EEFr (μ g/ml)	IC
<i>EtOH</i>	4%
12,5	56,5%
25	80%
50	92,7%
100	100%

O triterpeno também foi utilizado para o tratamento durante as curvas de crescimento com promastigotas de *L. amazonensis*. De acordo com a Tabela 4 pequenas concentrações de 2 e 5 μ g/ml do triterpeno, diluído em etanol (0,3%),

possuem atividade tóxica inibindo respectivamente 27% e 80% das formas promastigotas de *Leishmania* observadas em cultura. Na concentração de 1µg/ml o triterpeno apresentou uma pequena inibição significativa de IC 9%. Teles et al. (2011) sugerem o IC₅₀ para o triterpeno na concentração de 3,3µg/ml ($r^2_{adj} = 0,98$; $F=1889,8$; $P<0,001$).

Tabela 4: **Inibição da Crescimento** do triterpeno isolado do extrato etanólico dos frutos de *C. leprosum* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Concentrações do Triterpeno (µg/ml)	IC	
<i>EtOH</i>	0,3%	IC 27%
1	9%	
2	27%	IC 80%
5	80%	
100	100%	

DISCUSSÃO

A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de medicamentos, não foi representada apenas pelo surgimento de grupos novos de compostos, mas proporcionou a identificação de uma nova possibilidade de tratamento terapêutico. As opções de intervenções terapêuticas seriam muito escassas, se não fosse a descoberta dessas substâncias ativas provenientes das plantas medicinais (SIMÃES et al., 1999).

As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável trouxeram novas perspectivas ao estudo das plantas medicinais brasileiras. Cenário que aumentou a relevância da fitoterapia na pesquisa contemporânea. O uso de extratos e constituintes bioativos de plantas medicinais com validação científica pode beneficiar a população carente por meio de chás, tinturas e pós. A iniciativa também proporciona a descoberta de novos princípios ativos de interesse terapêutico e com potencial interesse pelas indústrias

farmacêuticas, que podem empregar essas substâncias em cápsulas, comprimidos e pomadas (LORENZI & MATOS, 2002).

Estudos que testam a efetividade de produtos comerciais devem considerar, se possível, além dos constituintes farmacêuticos, as concentrações de cada princípio ativo presente, visando, dessa forma, identificar a ação de cada componente, de modo a permitir a comparação e análise dos resultados.

Para avaliar a ação dos produtos isolados de *C. leprosum* nesse estudo foram utilizadas concentrações mínimas e máximas para a averiguação da formação de halo, indicando uma resistência ou sensibilidade. O triterpeno não apresentou bioatividade para *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Para a bactéria *P. aeruginosa* e a levedura *C. albicans* o triterpeno lupano e o extrato etanólico não obtiveram formação de halo, isto indica uma enorme resistência ao produto testado. A formação de halo para *P. mirabilis* e *K. pneumoniae* com o triterpeno são menores ou iguais aos formados pelo etanol, provavelmente neste caso o que está fazendo efeito bactericida deve ser o diluente e não a substância purificada. Em concentrações mínimas do Triterpeno Lupano (3-15µg/ml) houve resistência para com todas as cepas utilizadas.

Já em relação ao *S. aureus* e *E. coli* os valores dos halos formados foram superiores ao diluente mostrando-se ativo nas concentrações de 125µg/ml do triterpeno. Os valores relativos à média dos halos de inibição obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana do Triterpeno Lupano através do método de difusão em ágar podem ser observados na Tabela 1 e 2. A concentração utilizada, cerca de 50%, foi a concentração máxima para a dissolução de 500µg/ml do triterpeno, no entanto, foi descartada a possibilidade desse solvente como agente bactericida nos testes envolvendo essas duas bactérias nas concentrações de 125 e 250µg/ml), já que a porcentagem de álcool nessas últimas foi menor e todas elas apresentaram um halo maior que o apresentado pelo grupo tratado com o solvente a 50%. Desta forma, foi verificado que *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se mais sensíveis às concentrações-teste utilizadas do que os outros microrganismos ainda que a diferença entre os halos obtidos em comparação ao diluente mostrou-se pequeno.

Já o efeito do extrato etanólico sobre os diferentes microrganismos apresentou um maior espectro de ação com atividade sobre *P.mirabilis*, *E. coli*, *S.*

aureus e *K. pneumoniae*. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato do extrato apresentar não somente o triterpeno, mas também outras substâncias ativas como flavonóides, bibenzilas aromáticas, estilbenos, fenantrenos, lignanas, α -aminoácidos e em menor quantidade alcalóides (FACUNDO et al., 1993; PIETROVSKI et al., 2005).

Os dados obtidos nesse estudo tornam-se relevante para complementar a literatura sobre a ação de compostos isolados dessa planta pouco estudada; já existe confirmação da ação em síntese da atividade antinociceptiva do Extrato etanólico e Triterpeno lupano obtidos da planta *Combretum leprosum*. O EEFr e os triterpenos TTHP e ácido arjunólico, obtidos das flores do *C. leprosum* apresentaram uma importante ação antinociceptiva, tanto na nocicepção de origem neurogênica e inflamatória, avaliada em camundongos (FACUNDO et al., 2005; PIETROVSKI et al. 2005). Teles et al. (2011) destacam o potencial dos triterpenos isolados e modificados de *C. leprosum* para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas

Há algumas décadas se realizam estudos de óleos, extratos e compostos isolados de plantas frente aos protozoários para que se consigam drogas eficazes, menos tóxicas e com ação mais rápida contra as doenças acometidas por esses microrganismos. Kayser et al. (2003) em sua revisão enumeram vários produtos naturais isolados que apresentam potente ação antiparasitária, dentre eles alcalóides como berberine derivados da família *Berberidaceae* com ação contra espécies de *Trypanosoma* e amastigotas de *L. donovani* e *L. panamensis*, naphthylisoquinolines isolados de *Triphophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) com ação contra *Plasmodium falciparum*, sesquiterpenos e flavonóides antimaláricos originados de *Artemisia annua* (Asteraceae).

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias não contagiosas que constituem um sério problema de saúde pública no Brasil. Apesar de serem conhecidas há muito tempo e dos inúmeros estudos voltados ao seu entendimento, as leishmanioses são consideradas, ainda, doenças emergentes e sem controle – doença de categoria I – responsável por considerável morbidade e desfiguração facial extensa nos indivíduos afetados. A prevenção destas doenças depende de medidas ecológicas, sanitárias, assim como emprego de fármacos antiparasitários eficazes e seguros (DESJEUX, 1996; ASHFORD, 2000).

Baseado nessas considerações foi proposta desse estudo avaliar também a ação do EEFr e do triterpeno isolado contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Observou-se que quando submetidos ao tratamento com EEFr dos frutos de *C. leprosum* esses parasitas tem seu crescimento inibido de maneira dose dependente. A concentração de 100µg/ml foi capaz de matar 100% dos parasitas com 24 horas de incubação. Na cultura tratada com álcool, solvente utilizado para a dissolução do EEFr, houve diferença significativa do índice de inibição de crescimento (IC 4%) em relação ao grupo controle sem tratamento. A concentração utilizada, cerca de 1%, foi a concentração máxima para a dissolução de 100µg/ml do EEFr, no entanto, foi descartada a possibilidade desse solvente como agente letal nos testes envolvendo as outras concentrações do extrato (12,5, 25 e 50µg/ml), já que a porcentagem de álcool nessas últimas foi menor e todas elas apresentaram um IC significativamente maior que o apresentado pelo grupo tratado com o solvente a 1%. Essa atividade citotóxica para o parasita pode estar relacionada a vários compostos presentes no extrato dessa espécie já citado por FACUNDO et al. (1993), PIETROVSKI et al. (2005) e Teles et al. (2011).

A purificação do triterpeno lupano (3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno) ajudou a definir uma das substâncias tóxicas para *L. amazonensis*. Os ensaios realizados com essa substância mostraram uma potente inibição do crescimento das promastigotas a partir do segundo dia de incubação. Observou-se que na concentração de 5µg/ml houve uma redução de 80% do crescimento, diferença expressiva quando comparada ao grupo tratado com álcool a 0,3%.

O triterpeno apresentou efeito leishmanicida sobre a maioria do isolados de Leishmanias estudados, no entanto, não houve eliminação total dos parasitas como observado com droga controle, a Pentamidina. Embora Pentamidina tenha se mostrado mais eficiente na eliminação desses parasitas, esse fármaco quando administrado no paciente com leishmaniose induz efeitos adversos e citotóxicos como alterações cardíacas, hepáticas e renais (CUNNINGHAM, 2002; OUELLETTE et al., 2004).

Testes farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos envolvendo o triterpeno são necessários para avaliar sua toxicidade no hospedeiro, mas essa

substância parece ser um forte candidato para o desenvolvimento de drogas contra a leishmaniose.

Dentre todos os microrganismos estudados nesse experimento, o protozoário *Leishmania* apresentou-se o mais susceptível ao triterpeno, com inibição de crescimento em concentrações mínimas da droga (2-5µg/ml). Esse comportamento da droga pode estar relacionado à ação específica dessa substância em alguma via metabólica desse tipo celular.

Vários metabólitos secundários de plantas têm apresentado inibição de crescimento satisfatória em ensaios *in vitro* com espécies de *Leishmania*. Um exemplo são os diterpenos isolados de *Premna schimperi* e *P. oligotricha* com atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. aethiopica* (HABTEMARIAM, 2003). Os diterpenos e triterpenos isolados de *Cistus monspeliensis* e *Cistus creticus* são outras substâncias que apresentaram ação *in vitro*, verificada pela técnica de MTT, contra formas promastigotas de *L. donovani* (FOKIALAKIS et al., 2006); já cetonas cíclicas como a lactona klaivanolide de *Uvária klaineana* também foram descritas como potentes drogas antileishmania, IC₅₀ 3,12µM, contra formas promastigotas de *L. donovani* resistentes a anfotericina B (AKENDENGUE et al., 2002).

Nesse estudo a avaliação citotóxica para os diferentes microrganismos utilizados aponta para a especificidade do triterpeno e EEFr na morte de formas promastigotas de *L. amazonensis*. O mecanismo pelos quais os triterpenos inibem o crescimento de formas promastigotas de leishmanias não foi esclarecido até o momento, porém a importância das hidroxilas presentes nessas moléculas e sua ação nesses parasitas foi descrito por Torres-Santos et al. (2004) e Teles et al. (2011). Torres-Santos et al. (2004) estudaram a ação de 11 triterpenos isolados de *Pourouma guianensis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e descobriram que triterpenos pentacíclicos com maior número de grupos de hidroxilas apresentavam maior ação anti-promastigotas.

Os resultados obtidos nesse estudo contribuem para informações sobre a espécie com relação ao seu uso terapêutico, auxiliam na manutenção e valorização do saber popular sobre o uso de plantas medicinais e fortalecem, a partir de nossa biodiversidade, a produção local de fármacos de origem natural de baixo custo visando uso múltiplo e desenvolvimento sustentável.

REFERÊNCIAS

- AKENDENGUE B.; ROBLLOT, F.; LOIDEAU, P.M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. **Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*. v. 59, n.8, p. 885-8, 2002.**
- ALEXANDER, D. M.; BHANA, N.; BHIKA, K. H.; ROGERS, C. B. **Antimicrobial testing of selected plant extracts from *Combretum* species. *S. Afr. J. Sci.*, v. 88, p. 342-44, 1992.**
- ASHFORD, R.W. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. v.30, p. 1269-81, 2000.**
- BABU SPS, Sarkar D, Ghosh NK, Saha A, Sukul NC, Bhattacharya S. **Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. *Jpn J Pharmacol* v.75, p. 451-454, 1997.**
- BREYTENBACH, J. C. e MALAN, S. F. **Pharmacochemical properties of *Combretum zeyheri*. *S. Afr. J. Sci.*, v. 85, p. 372-74, 1989.**
- CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 179-189, 2000.**
- CHOWDHURY, R. e ISLAM, N. **Ahydroxylated mansumbin-28-oic acid from *Combretum coccineum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 32, p. 443-445, 2004.**
- CUNNINGHAM, A.C. **Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental Molecular Pathology*. v. 72, p. 132-141, 2002.**
- DESJEUX, P. **Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*. v. 14, p. 417-423, 1996.**
- ELISABETSKY. **Pesquisa em plantas medicinais. *Ciências e Cultura* v. 39, p.607-702, 1987.**
- ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/Organizado por Simões, C.M.O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. Da UFSC, p. 87-99, 1999.**
- ELISABETSKY, E., WANNMACHER, L. **The status of ethnopharmacology in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 38, p.137-143, 1993.**
- FACUNDO V. A.; ANDRADE, C. H. S.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C. D. **Triterpenes and Flavonoids from *Combretum leprosum*. *Phytochemistry*, v. 32, p. 411-415, 1993.**

FACUNDO, V.A.; RIOS, K.A.; MEDEIROS, C.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; MIRANDA, A.L.P.; EPIFANIO, R.A.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, A.T.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. **Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 00: 2005.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTRÖM, C.A.; VUORELA, H.; HILTUNEM, R.; VUORELA, P. **Ethobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania.** *J. of Ethnopharmacology*, v.79, p. 169-177, 2002.

HABTEMATIAM, S. **In vitro antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperi* and *P. oligotricha*.** *BMC Pharmacology*. v. 3, p.1-6, 2003.

KAISER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. **Natural products as antiparasitic drugs.** *Parasitol Res*. v. 90, p. 55-62, 2003.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. **Antimicrobial activity of KUMATE J. Infectious disease in the 21st century.** *Arch Med Res* v. 28, p. 155-161, 1997.

LIRA, S. G. e SILVEIRA, E. R., 2003. **Constituintes Químicos Fixos e Voláteis de *Combretum laxum* (Combretaceae).** Disponível em <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0763-1/>>. Acesso em: 04 fev. 2003.

LIRA, S. R. D.; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S.; DUARTE, J. C. **Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol extract of *Combretum leprosum*.** *Pharm. Biol*, v. 40, p. 213-215, 2002.

LORENZI H, Matos FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO TB, Pinto AV, Pinto MCFR, Leal ICR, Silva MG, Amara CF, Kuster LRM, Neto KR. **In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Int J Antimicrob Ag* v.21, p. 279-284, 2003.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. **Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae).** *J. Ethnopharmacol.*, v. 93, p. 207-12, 2004.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. **Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae).** *J. Ethnopharmacol.*, v. 93, p. 207-212, 2004.

MARTINI, N. e ELOFF, J. N. **The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae).** *J. Ethnopharmacol.*, v. 62, p. 255-263, 1998.

MASIKA, P. J. e AFOLAYAN, A. J. **Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa.** *J.Ethnopharmacol.*, v. 83, p. 129-134, 2002.

MATOS, F. J. A., 2003. **Plantas Medicinais do Ceará.** Disponível em: <<http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/medic/taxa/377.shtml>>. Acesso em: 04 fev. 2003.

MIGUEL MD, MIGUEL OG. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** 2ed. São Paulo: Robe Editora, 2004.

NCCLS (**National Committee for Clinical Laboratory Standards**), 2000. OULLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates.* v. 7, p.257-66, 2004.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A; FACUNDO, V.A; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. **Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* v. 83, n. 1, p.90-9, 2006.

SILVA-JARDIM, I. **Papel dos proteassomas na interação e desenvolvimento de *L. chagasi* em macrófagos murinos.** Ribeirão Preto: USP, 2001. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2001.

SIMÃES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Editora da Universidade e Editora da UFSC, 1999. SNYDER, S. H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science*, v. 257, p. 494-496, 1992.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. de A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.