

ATIVIDADE ANTITRIPANOSOMAL DA *Galianthe palustris*¹

Júlia Montibeller da Cruz², Joyce Graziela de Oliveira³, Rafaela Gomes⁴, Gabriela Kaiser Borges⁵, Amanda Leite Bastos Pereira⁶.

¹ Vinculado ao projeto “Atividades antimicrobiana e antitripanossomal da *Borreria palustris*”

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV- bolsista PIBIC

³ Mestre em Produção Vegetal – CAV.

⁴ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV.

⁵ Doutoranda do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular - CAV

⁶ Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – amanda.pereira@udesc.br

Trypanosoma evansi é um protozoário unicelular flagelado, agente etiológico da doença conhecida como Mal das Cadeiras ou Surra, no Brasil, o *T. evansi* afeta principalmente equinos e a prevalência da infecção varia de região para região, tendo alta prevalência na região sul, causando impacto econômico e na saúde. As contrariedades envolvendo a doença se dão principalmente no diagnóstico inadequado e no tratamento farmacológico, onde as drogas disponíveis, como o aceturato de diminazeno, possuem alta hepatotoxicidade, além de causar resistência. Pensando nessa problemática, uma alternativa seria a utilização de tratamentos fitoterápicos, uma vez que muitos fármacos possuem seus compostos ativos de origem vegetal.

Nesse sentido, o objetivo de estudo foi avaliar a ação antitripanossomal contra o *T. evansi* *in vitro* da espécie *Galianthe palustris*, conhecida popularmente como ‘erva-de-lagarto’, amplamente distribuída por Santa Catarina e utilizada pela comunidade local para tratamento de picadas de cobras e escorpiões, dores reumáticas e feridas, incluindo as infeccionadas. Para a realização do estudo a amostra da planta (partes aéreas e raiz) foi coletada, desidratada e triturada em processador doméstico para a produção de três diferentes extratos na concentração de 10%, com os seguintes solventes: água destilada, etanol e solução hidroetanólica (70% água destilada e 30% etanol).

Para a obtenção dos extratos etanólico e hidroetanólico, 10 g da amostra foi dissolvida em uma alíquota do seu respectivo solvente e após transferidas para um balão volumétrico (100 mL) para ser completado o volume. Os extratos foram armazenados em frasco de vidro âmbar e mantidos em refrigeração durante 7 dias, sendo após, filtrados à vácuo com papel filtro e armazenados refrigerados até o momento das análises.

Para a obtenção do extrato aquoso, foi utilizada a mesma proporção dos demais extratos, entretanto, ele foi aquecido dentro de um bêquer tampado com papel alumínio, até atingir a fervura, permanecendo por 5 minutos. Após, o extrato foi resfriado a temperatura ambiente e filtrado para posterior armazenamento até o momento das análises.

Com o extrato aquoso, etanólico e hidroetanólico obtidos, a atividade *in vitro* foi realizada em cultura axênica de parasitas, com os extratos nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, sendo a contagem de *T. evansi* feita na câmara de Neubauer em 1, 3, 6, 9 e 12h de cultivo, indicando o número de parasitas viáveis.

Para o cultivo dos parasitas foi escolhida a metodologia de Baltz (1995) com adaptações de Baldissera et al (2013). Já Para a obtenção dos parasitas, camundongos (*Mus musculus*) machos adultos, linhagem Swiss, no Laboratório de Farmacologia da UDESC foram inoculados com o *T. evansi*, onde a parasitemia foi acompanhada por meio de esfregaço sanguíneo, e ao

atingir o número de aproximadamente 50 parasitas/campo, o sangue total do animal infectado foi coletado por punção cardíaca, seguindo as diretrizes do CONCEA.

Para a visualização e contagem desses parasitas, foi usada a câmara de Neubauer, contando os quatro quadrantes, em duplicata, em um período de 1,3,6,9 e 12 horas de experimento/contagem. Já na primeira hora de incubação, a morfologia e motilidade dos parasitas foram checadas com auxílio de um microscópio óptico no aumento de 40x sob luz baixa.

Além disso, foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade em células mamíferas. Para a realização deste teste, foram depositadas $1,0 \times 10^4$ células Vero em placa de 96 poços. Em cada poço, 100 µL de células cultivadas em meio DMEM acrescidas de 10 µL dos tratamentos e 10% de Soro fetal bovino (SFB). O grupo controle foi cultivado com 100 µL de meio DMEN acrescido de 10% de SFB, além do controle branco foi feito apenas com 100 µL do meio sem o SFB. O teste MTT foi realizado no intervalo de 24 horas após o plaqueamento. Primeiramente foi retirado o conteúdo de cada poço, sendo substituído por 100 µL de meio fresco, adicionado 10 µL da solução 12mM de MTT e incubados a 37°C por 4 horas. Após, foi removido 85 µL do volume de cada poço e adicionado 50 µL de dimetil sulfóxido em cada poço, e incubados a 37°C por 10 minutos. Cada poço foi homogeneizado, e a placa foi colocada no agitador de placas por 5 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância das amostras foi feita a 490nm.

Os resultados da contagem são comparados com o Grupo Veículo por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni, considerando o nível de significância (p) menor que 0,05.

Todos os extratos apresentaram diminuição no número de parasitas, com todas as concentrações testadas. O extrato hidroetanólico zerou a contagem dos tripanossomas em 12h de experimento na concentração de 2%, não havendo diferença estatística deste para o controle positivo em tal hora. Já o extrato etanólico na concentração de 2%, apresentou um resultado ainda mais satisfatório, quase zerando a contagem de tripanossomas em 9h, e se igualando ao meio com Diminazeno na hora 12. E o extrato aquoso, apesar de ter diminuído a contagem, não zerou em nenhuma das concentrações testadas, ainda que a concentração de 2% tenha mostrado diminuição considerável no número de parasitas viáveis através das horas de experimento.

Já em relação ao teste da citotoxicidade, o extrato aquoso apresentou 64.25% de viabilidade das células, 66% o extrato hidroetanólico, e o etanólico 27.38% de viabilidade em 24h de teste. Pode-se verificar que a perda de viabilidade do extrato etanólico foi significativa estatisticamente, sendo o extrato considerado tóxico para as células mamíferas.

Em suma, apesar dos resultados promissores para os extratos de erva-de-lagarto no que diz respeito a atividade antitripanossomal *in vitro*, especialmente para o etanólico, o mesmo extrato apresentou baixo nível de viabilidade em células mamíferas. Mais investigações poderão ser realizadas, em busca do princípio ativo responsável por essa atividade, e mecanismo de ação, além da possibilidade da realização de outros testes de citotoxicidade, com concentrações mais baixas dos extratos, que também apresentaram nível de ação antitripanossomal, bem como confirmação da atividade em modelo animal.

Palavras-chave: Antitripanossomal, *Galianthe palustris*, *Trypanosoma evansi*