



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA – CCSST
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

CAROLINE MARTINS DE JESUS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E
FRAÇÕES DE *Cinnamomum verum* J.S. PRESL (LAURACEA)

IMPERATRIZ - MA

2023

CAROLINE MARTINS DE JESUS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÕES DE
Cinnamomum verum J.S. PRESL (LAURACEA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Aramys Silva Reis
Coorientador(a): Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva

IMPERATRIZ - MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

MARTINS DE JESUS, CAROLINE.

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E
FRAÇÕES DE *Cinnamomum verum* J.S. PRESL LAURACEA / CAROLINE
MARTINS DE JESUS. - 2023.

59 f.

Coorientador(a): LUCILENE AMORIM SILVA.

Orientador(a): ARAMYS SILVA REIS.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Tecnologia/ccim, Universidade Federal do Maranhão,
IMPERATRIZ, 2023.

1. Apoptose. 2. *Cinnamomum*. 3. Fração Hexânica. 4.
Leishmania. I. AMORIM SILVA, LUCILENE. II. SILVA REIS,
ARAMYS. III. Título.

CAROLINE MARTINS DE JESUS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÕES DE
Cinnamomum verum J.S. PRESL (LAURACEA)

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia.

Aprovada em: 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aramys Silva Reis (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Queli Cristina Fidelis (Titular)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira (Titular)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dra. Luecya Alves de Carvalho Silva (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Richard Pereira Dutra (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

*Não foi eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso! Não se apavore e nem
desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará
com você por onde você andar.
Josué 1:9*

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Maria Gercina Silva Martins e Newton Martins (*in memoriam*), e à minha mãe Kátia Cilene Silva Martins, por sempre me apoiarem nos meus estudos e acreditarem nos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e ser sempre o suporte que me sustenta e me dá forças quando preciso!

À minha vó que também tem sido mãe desde a minha existência. Graças ao seu apoio incondicional e por nunca deixar que nada faltasse ao longo dessa caminhada, que estou conseguindo realizar mais esse sonho!

Ao meu avô (*in memoriam*) que foi a minha figura paterna e que, juntamente com minha vó, decidiu acreditar e investir no meu futuro. Sinto muito a sua falta e por mais que não esteja mais aqui será sempre lembrado, pois essa conquista sempre será de nós três!

À minha mãe pelo seu amor, apoio, orações e por acreditar que eu sou capaz de alcançar a todos os meus objetivos!

Às minhas tias, meu tio e meu irmão, por sempre vibrarem e torcerem por mim a cada passo dado!

Aos meus dois orientadores, Aramys Reis e Lucilene Amorim. Obrigada por cada oportunidade de aprendizado e crescimento. Palavras me faltam para expressar a minha gratidão por tudo o que fizeram por mim e por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos!

Aos laboratórios LIF (Laboratório de Imunofisiologia), LPI (Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia), LAFIT (Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica) e LQPN (Laboratório de Química de Produtos Naturais) em especial aos amigos: Luis Douglas, Louriane Nunes, Mércia Araújo, Aldilene, Marina Barros, Sthephany Goulart, Aline Santana, Sabrina Luíza, Josivan Regis, Sulayne Araújo, Arthur André, dona Sônia.

Às minhas amigas Alanna Barros, Carla Daniele, Hilka Batista, Lillian Gomes, Thayse Layse, Beatriz Ferreira, Marliane Cantranhede, Thaynara Aguiar e Karine Pereira por todos os momentos de descontração, conversas, palavras de apoio, fé e ânimo. Sou grata por ter a amizade tão valiosa de cada uma!

Aos professores parceiros deste trabalho na pessoa da professora Cláudia Quintino e Richard Pereira Dutra.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia – UFMA, pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA pelos auxílios fornecidos.

RESUMO

A Leishmaniose representa um sério problema de saúde pública atingindo milhões de pessoas anualmente. Atualmente, as opções terapêuticas para o seu tratamento possuem importantes efeitos adversos, sendo essencial a busca de novas substâncias ativas. *Cinnamomum verum*, conhecida popularmente como canela, tem sido amplamente estudada quanto as suas atividades farmacológicas, entre elas está o seu potencial antileishmania porém, a maioria dos trabalhos estão associados ao seu óleo essencial e além disso, não se tem informações a cerca do possível mecanismo de ação exercido por essa espécie. Por isso, nesse estudo nós avaliamos a atividade antileishmania do extrato hidroetanólico e frações das folhas de *C. verum* e buscamos identificar o mecanismo de ação associado a morte celular. A atividade citotóxica sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e em macrófagos RAW 264.7 foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, e a partir do fracionamento biomonitorado em formas promastigotas, foi selecionado a fração mais ativa para que fosse realizada a caracterização química através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, sendo ainda feita a investigação do tipo de morte celular associada ao efeito biológico a partir do ensaio de Brometo de etídio e Azul de acridina no período de 4 horas. Tendo em vista que se trata de uma espécie vegetal com potenciais farmacológicos importantes, porém com poucos estudos voltados para a extratificação das folhas com solventes de polaridades variadas testados na leishmania, esta pesquisa traz informações importantes acerca da sua composição química e possíveis mecanismos de ação. Importante ressaltar que a execução das técnicas aqui expostas, se beneficiaram de parcerias com laboratórios de outras instituições, bem como a utilização de equipamentos com tecnologia avançada, garantindo a confiabilidade e qualidade dos resultados obtidos, além do uso de protocolos acessíveis com possível replicação de dados. A fração Hexânica, rica em fitol, se mostrou altamente seletiva para as formas promastigotas e amastigotas *in vitro* de *L. amazonensis* tendo como mecanismo de morte celular, a apoptose. Esses dados reforçam o potencial leishmanicida da fração hexânica de *C. verum* e o seu possível uso como coadjuvante farmacológico no tratamento da leishmaniose, uma doença que ainda atinge um número expressivo de pessoas ao redor do mundo, podendo ainda ser utilizado na produção das mais variadas formulações para fins terapêuticos gerando assim, tanto um impacto social quanto econômico com a diminuição de gastos destinados para o seu tratamento.

Palavras-chave: *Leishmania*; *Cinnamomum*; Fração Hexânica; Apoptose.

ABSTRACT

Leishmaniasis represents a serious public health problem affecting millions of people annually. Currently, the therapeutic options for its treatment have important adverse effects, being essential the search for new active substances. *Cinnamomum verum*, popularly known as cinnamon, has been widely studied for its pharmacological activities, including its antileishmania potential, however, most studies are associated with its essential oil and, in addition, there is no information about the possible mechanism of action exercised by this species. Therefore, in this study we evaluated the antileishmanial activity of the hydroethanolic extract and fractions of the leaves of *C. verum* and sought to identify the mechanism of action associated with cell death. Cytotoxic activity on promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis* and on RAW 264.7 macrophages was performed using the MTT colorimetric assay, and from the biomonitored fractionation in promastigotes forms, the most active fraction was selected for chemical characterization through Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, and the investigation of the type of cell death associated with the biological effect is also carried out using the Ethidium Bromide and Acridine Blue assay over a period of 4 hours. Bearing in mind that this is a plant species with important pharmacological potential, but with few studies focused on extracting the leaves with solvents of different polarities tested in *Leishmania*, this research brings important information about its chemical composition and possible mechanisms of action. It is important to emphasize that the execution of the techniques exposed here benefited from partnerships with laboratories from other institutions, as well as the use of equipment with advanced technology, guaranteeing the reliability and quality of the results obtained, in addition to the use of accessible protocols with possible data replication. The Hexanic fraction, rich in phytol, proved to be highly selective for in vitro promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis*, having apoptosis as cell death mechanism. These data reinforce the leishmanicidal potential of the hexanic fraction of *C. verum* and its possible use as a pharmacological adjuvant in the treatment of leishmaniasis, a disease that still affects a significant number of people around the world, and can also be used in the production of the most varied formulations for therapeutic purposes, thus generating both a social and economic impact with the reduction of expenses destined for its treatment.

Keywords: *Leishmania*; *Cinnamomum*; Hexane Fraction; Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica de LVA (a) e LC (b).....	16
Figura 2 - Úlcera leishmaniótica no membro superior, com crostas e bordas elevadas	17
Figura 3 - Transmissão e estabelecimento da infecção por leishmaniose durante o repasto sanguíneo de flebotomíneo	19
Figura 4 - Ciclo de vida digenético da leishmaniose.....	20
Figura 5 – Estruturas químicas das drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose	21
Figura 6 – Vias metabólicas como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose.	24
Figura 7 - Árvore do gênero <i>Cinnamomum</i>	26
Figura 8 - Estruturas químicas dos constituintes presentes no gênero <i>Cinnamomum</i>	28
Figura 9 - Distribuição mundial de <i>C. verum</i> J. Presl.....	29
Figura 10 - Diferentes partes de <i>C. verum</i> J. Presl	29
Figura 11 - Viabilidade de promastigotas de <i>L.amazonensis</i> tratadas por 48 horas com o extrato bruto e frações de <i>C. verum</i>	36
Figura 12 – Viabilidade de amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos RAW 264.7 tratados por 24 horas com a FH de <i>C. verum</i>	37
Figura 13 – Marcação de células necróticas/apoptóticas com brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA) em formas promastigotas e amastigotas	39
Figura 14 – Porcentagem de células promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L.amazonensis</i> necróticas e apoptóticas	40
Figura 15 - Análise de CG-EM da FH de <i>C. verum</i>	41
Figura 16 –Estruturas químicas dos principais componentes presentes na FH de <i>C. verum</i> ...42	
Figura Suplementar 1 – Obtenção de formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos químicos representativos do gênero <i>Cinnamomum</i>	27
Tabela 2 – Efeito do extrato bruto e das frações de <i>C. verum</i> nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e linhagem de macrófagos murinos RAW. 264.7.	37
Tabela 3 – Efeito da Fração Hexânica de <i>C. verum</i> nas formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> e linhagem de macrófagos murinos RAW. 264.7.	38
Tabela 4 - Composição química da FH de <i>C. verum</i> por CG-.EM.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

DNA – Ácido dextrorribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

FDA – Federal Drug Administration

EUA – Estados Unidos da América

Th1 – Células T auxiliares tipo 1

IFN- γ – Interferon-gama

IL-12 – Interleucina 12

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

EB – Extrato Bruto

FH – Fração Hexânica

FDCM – Fração Diclorometano

FAE – Fração Acetato de Etila

FA – Fração Aquosa

SFB – Soro Fetal Bovino

pH – Potencial de hidrogênio

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por microlitro

μL – microlitro

IC₅₀ – Concentração Inibitória

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)

DMSO – Dimetil sulfóxido

CO₂ – Dióxido de carbono

CC₅₀ – Concentração Citotóxica

BE/LA – Brometo de Etídio / Laranja de Acridina

PBS – Tampão fosfato-salino

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massa

ANOVA – Análise de Variância

DO – Densidade Óptica

SI – Índice de Seletividade

AGS - Adenocarcinoma Gástrico Humano

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivos específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Leishmanioses.....	15
3.2 Leishmaniose Cutânea	17
3.2.1 Etiologia, Vetor e Ciclo Biológico	18
3.3 Tratamento	20
3.3.1 Antimoniais Pentavalentes.....	21
3.3.2 Anfotericina B	22
3.3.3 Pentamidina / Paromicina	23
3.3.4 Miltefosina.....	23
3.4 Alvos metabólicos de <i>Leishmania</i> ssp e os mecanismos de morte associados...24	
3.5 Produtos naturais e suas aplicações na terapêutica da leishmaniose	25
3.6 O gênero <i>Cinnamomum</i>	26
3.6.1 Composição Química.....	27
3.6.2 <i>Cinnamomum verum</i>	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material vegetal	31
4.2 Ensaio Biológicos e Caracterização Química	31
4.2.1 Manutenção das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
4.2.2 Diferenciação das formas promastigotas em amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	32
4.2.3 Atividade Antileishmania <i>in vitro</i>	32
4.2.4 Manutenção de macrófagos RAW 264.7.....	33
4.2.5 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, <i>in vitro</i>	33

4.2.6 Ensaio de MTT	33
4.2.7 Ensaio Tipo de morte celular via marcação por Brometo de Etídio/ Laranja de Acridina (BE/LA)	34
4.2.8 Caracterização química por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)	34
4.3 Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Fração hexânica de <i>C. verum</i> apresenta atividade antipromastigota, <i>in vitro</i>	36
5.2 Fração hexânica de <i>C. verum</i> inibe crescimento de formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> , <i>in vitro</i> , de forma dose dependente	37
5.3 Fração hexânica de <i>C. verum</i> induz morte por apoptose em formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	38
5.4 Caracterização química da Fração hexânica de <i>C. verum</i>	40
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE	56

