



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA, CAMPUS
AVANÇADO – IMPERATRIZ/MA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

MARIA SIMONE PEREIRA MACIEL MIGNONI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE
***Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae)**

IMPERATRIZ - MA

2021

MARIA SIMONE PEREIRA MACIEL MIGNONI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE
Marsypianthes chamaedrys (Lamiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Interdisciplinar.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Queli Cristina Fidelis

Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

IMPERATRIZ - MA

2021

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

MIGNONI, MARIA SIMONE PEREIRA MACIEL.

Composição química e atividade leishmanicida de extratos de *Marsypianthes chamaedrys* Lamiaceae / MARIA SIMONE PEREIRA MACIEL MIGNONI. - 2021.

89 p.

Coorientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Orientador(a): Queli Cristina Fidelis.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Tecnologia/ccsst, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2021.

1. Leishmanicida. 2. *Marsypianthes chamaedrys*. 3. Metabolitos ativos. I. Fidelis, Queli Cristina. II. Reis, Aramys Silva dos. III. Título.

MARIA SIMONE PEREIRA MACIEL MIGNONI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE
***Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde e Tecnologia.

Área de concentração: Interdisciplinar.

Aprovado em: 27/08 /2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Queli Cristina Fidelis
Doutora em Ciências – Química Orgânica (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Fernandes Pereira
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria Mendes Oliveira
Doutora em Ciências – Química Inorgânica
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, autor da vida e presença fiel ao meu lado sempre, agradeço-lhe não só a benção de alcançar os meus objetivos mais também a tudo que sempre me concedeu sem eu pedir ou mesmo merecer. Aos meus pais, Rita de Cássia Pereira Maciel e João Batista Maciel, as pessoas responsáveis por me tornar quem hoje sou, que eu busque no exemplo de luta e perseverança de vocês a inspiração para me tornar a cada dia uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a virgem Maria, mãe de Jesus Cristo e minha intercessora, por me proteger sempre do mal, como uma boa mãe sempre faz.

Meu muito obrigado aos meus pais Rita de Cássia Pereira Maciel e João Batista Maciel, quero que saibam que vocês são mais merecedores que eu do mérito desta conquista e peço a Deus que eu consiga atender a todas as suas expectativas como profissional e filha. E a todos que compõem a minha família pelo apoio e carinho, em especial ao meu marido Jorge Arthur Nascimento Mignoni por toda paciência e apoio nessa caminhada, a minha irmã, Rita Margarete, obrigada pela ajuda e apoio nos momentos em que precisei.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, Marcos Marinho de Sousa Júnior, Gislane Romano Mendonça, Guilherme Martins Gomes Fontoura, Rafaela Cristina Gomes Araújo, Wanderson Lopes Santos Freitas, Wanderson Barros, Wherveson de Araújo, Victor Pereira Lima e Paula Gabrielle Gomes Candido, por toda ajuda ao longo do caminho.

Agradeço a minha orientadora, prof. Queli Cristina Fidelis, que acreditou em mim, me incentivou, sendo sempre uma constante fonte de motivação e auxílio ao longo de todo o caminho. Muito obrigado a todos os meus professores, em especial a Ana Lucia, Ismália Dias e Adriana Nogueira, pelo amor que vocês têm ao seu trabalho, um exemplo a ser seguido.

A todos do Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica da Universidade Federal do Maranhão, em nome do Prof. Dr. Aramys Reis Silva, pela colaboração na realização das atividades *in vitro*.

A todos do Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Imperatriz-MA, em nome do Prof. Dr. Richard Dutra e ao colega Marcos Marinho pela colaboração e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos professores Mário Geraldo de Carvalho e Rosane Nora Castro, ambos da UFRRJ e a Prof. Débora de Almeida Azevedo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas análises cromatográficas e espectroscópicas, a Regina Maria Mendes Oliveira pelo apoio financeiro, sem os quais este trabalho não seria possível.

Por fim agradeço a todos que passaram na minha vida nestes dois anos e em especial aqueles que ficaram e a modificaram de alguma forma.

Os que confiam no Senhor, são como o Monte de Sião, não se abala, mas permanece firme para sempre.

Salmo: 125

RESUMO

A leishmaniose é uma doença de grande ameaça aos países tropicais, sendo de alto impacto na saúde pública do Brasil. É curável, porém os fármacos utilizados no seu tratamento são altamente tóxicos e acarretam em graves efeitos adversos, além de gerar resistência. Nesta perspectiva, buscou-se avaliar a composição química e atividade leishmanicida da *Marsypianthes chamaedrys*, planta da família Lamiaceae com estudos ainda incipientes, mas promissora, pois a mesma é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, sendo que em alguns estudos demonstrou atividades analgésica, anti-inflamatória, antiedematogênica antifúngica, entre outras. No primeiro capítulo, levantou-se um referencial teórico a fim de explicar sobre o tema geral do trabalho, seguido do segundo capítulo com uma revisão da atividade leishmanicida de espécies da família Lamiaceae, a qual são apresentados extratos, frações e compostos não voláteis contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmanias* presentes nas Américas, África e Ásia. Ao todo foram encontradas quarenta e duas espécies de Lamiaceae, pertencentes a vinte e seis gêneros, e noventa e um constituintes, isolados de dezoito espécies dessa família, avaliados em ensaios leishmanicida *in vitro*. Aspectos químicos e biológicos de extratos, frações e constituintes isolados foram discutidos a fim de definir um perfil das plantas leishmanicidas dessa família, a partir dos resultados observados em ensaios *in vitro*. Ao todo são quarenta e duas espécies de Lamiaceae, pertencentes a vinte e seis gêneros, e noventa e um constituintes, isolados de dezoito espécies dessa família, avaliados em ensaios leishmanicida *in vitro*. No terceiro capítulo, o extrato etanólico de *M. chamaedrys* e suas frações em diclorometano (MCF-DM), hexano (MCF-DM) e em acetato de etila (MCF-AE), foram avaliados quanto à atividade leishmanicida para promastigotas de *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade frente a macrófagos RAW 264.7, utilizando o método de viabilidade celular com o reagente MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio). A composição química da melhor fração foi obtida por CLAE-DAD. O extrato e suas frações inibiram as formas promastigotas da *L. amazonensis*, sendo observada uma melhor ação leishmanicida na fração MCF-DM ($IC_{50} = 17,90 \pm 1,172 \mu\text{g/mL}$) em ensaios *in vitro*. Esta mesma fração MCF-DM ($CC_{50} >100$) foi efetiva na avaliação citotóxica contra células RAW 264.7 e demonstrou um melhor índice de seletividade ($IS > 5,5$). A análise química da fração em diclorometano por CLAE-DAD identificou, em comparação com o padrão, dois constituintes, um majoritário com área de pico de 35%, sendo este o ácido rosmarínico, e um segundo composto o ácido caféico com 5%, sendo que este último é identificado pela primeira vez na espécie, além de 15 compostos em menor quantidade, que possuem os espectros de UV com perfil de absorção compatível a compostos fenólicos. Os resultados permitem concluir que a fração MCF-DM apresenta potencial leishmanicida, baixa toxicidade celular, elevada concentração de compostos fenólicos podendo fornecer um modelo químico promissor para futuros estudos direcionados ao desenvolvimento de terapias leishmanicidas.

Palavras chaves: Lamiaceae, atividade leishmanicida, metabólitos bioativos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease of great threat to tropical countries, having a high impact on public health in Brazil. It is curable, but the drugs used in its treatment are highly toxic and lead to serious adverse effects, in addition to generating resistance. In this perspective, we sought to evaluate the chemical composition and leishmanicidal activity of *Marsypianthes chamaedrys*, a plant of the Lamiaceae family, with studies that are still incipient, but promising, as it is used in popular medicine as an anti-inflammatory, and in some studies it has shown analgesic activities, anti-inflammatory, anti-ophidic antiedematogenic, among others. In the first chapter, a theoretical framework was raised in order to explain the general theme of the work, followed by the second chapter with a review of the leishmanicidal activity of species of the Lamiaceae family, which presents extracts, fractions and non-volatile compounds against promastigote and amastigote forms of *Leishmania* present in the Americas, Africa and Asia. In all, forty-two species of Lamiaceae were found, belonging to twenty-six genera, and ninety-one constituents, isolated from eighteen species of this family, evaluated in in vitro leishmanicidal assays. Chemical and biological aspects of isolated extracts, fractions and constituents were discussed in order to define a profile of the leishmanicidal plants of this family, based on the results observed in in vitro assays. Altogether, there are forty-two species of Lamiaceae, belonging to twenty-six genera, and ninety-one constituents, isolated from eighteen species of this family, evaluated in in vitro leishmanicidal tests. In the third chapter, the ethanol extract of *M. chamaedrys* and its fractions in dichloromethane (MCF-DM), hexane (MCF-DM) and in ethyl acetate (MCF-AE) were evaluated for leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes and cytotoxicity against RAW 264.7 macrophages, using the cell viability method with the MTT reagent (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide). The chemical composition of the best fraction was obtained by HPLC-DAD. The extract and its fractions inhibited the promastigote forms of *L. amazonensis*, with a better leishmanicidal action in the MCF-DM fraction ($IC_{50} = 17.90 \pm 1.172 \mu\text{g/mL}$) in in vitro assays. This same MCF-DM fraction ($CC_{50} > 100$) was effective in the cytotoxic evaluation against RAW 264.7 cells and demonstrated a better selectivity index ($IS > 5.5$). The chemical analysis of the fraction in dichloromethane by HPLC-DAD identified, in comparison with the standard, two constituents, a major one with a peak area of 35%, this being rosmarinic acid, and a second compound, caffeic acid with 5%, being that the latter is identified for the first time in the species, in addition to 15 compounds in smaller quantities, which have UV spectra with an absorption profile compatible with phenolic compounds. The results allow us to conclude that the MCF-DM fraction has leishmanicidal potential, low cell toxicity, high concentration of phenolic compounds, and may provide a promising chemical model for future studies aimed at the development of leishmanicidal therapies.

Key-Words: Lamiaceae, leishmanicidal activity, bioactive metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I.	Revisão bibliográfica	
Figura 1 -	Ciclo da leishmaniose.....	19
Figura 2 -	Forma amastigota internalizadas por macrófago (A) e Forma promastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp.....	20
Figura 3 -	Fármacos usados no tratamento de leishmanioses.....	22
Figura 4 -	Bioma maranhense.....	23
Figura 5 -	<i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze.....	25
Figura 6 -	Compostos isolados de <i>M. chamaedrys</i>	26
Capítulo II	Potencial leishmanicida de espécies da família Lamiaceae: aspectos químicos e biológicos de constituintes não voláteis	
Figura 1 -	Estruturas de compostos fenólicos derivados de ácido cinâmico.....	47
Figura 2	Estruturas de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, fenilpropanóides e feniletanóides.....	48
Figura 3	Estruturas de triterpenos, diterpenos e esteróides.....	50
Figura 4	Estruturas de iridoides, lignanas e flavonóides.....	52
Capítulo III	Composição química e atividade leishmanicida de extratos de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Lamiaceae)	
Figura 1	Inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i>	69
Figura 2 -	Cromatogramas e espectros UV do extrato MCF-DM	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo II	Potencial leishmanicida de espécies da família Lamiaceae: aspectos químicos e biológicos de constituintes não voláteis	
Tabela 1	Atividade leishmanicida de extratos e frações de espécies da família Lamiaceae.....	35
Tabela 2	Atividade leishmanicida de compostos isolados de espécies da família Lamiaceae frente as formas promastigota (PM) e amastigota (AM) de espécies de <i>Leishmania</i> e índice de seletividade (SI).....	41
Capítulo III	Composição química e atividade leishmanicida de extratos de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Lamiaceae)	
Tabela 1 -	Atividade antipromastigota, citotóxica e índice de seletividade do extrato etanólico e frações de <i>M. chamaedrys</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

AM – Amastigota

CC₅₀ - Concentração citotóxica 50%

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Aberta

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CH₂Cl₂ – Diclorometano

CHCl₃ – Clorofórmio

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de alta eficiência com

DMEM – Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EEMC – Extrato Etanólico de *Marsypianthes chamaedrys*

ELIZA - Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

H₂O – Água

IC₅₀ – Concentração mínima inibitória 50%

LC - Leishmaniose cutânea

LM - Leishmaniose mucosa/monocutânea

LT – Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose visceral

MCF-AE - *Marsypianthes chamaedrys* fração em acetato de etila

MCF-DM - *Marsypianthes chamaedrys* fração em diclorometano

MCF-HE - *Marsypianthes chamaedrys* fração em hexano

Me₂CO – Acetona

MeOH – Metanol

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio brometo

PRO – Promastigota

RMN - Ressonância magnética nuclear

RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute medium

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro fetal bovino

TLC - Thin layer chromatography

tr – Tempo de retenção

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO I	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 A leishmaniose	18
3.1.1 Leishmaniose: ciclo de vida, protozoários e formas clínicas	19
3.1.2 Leishmaniose: Tratamento	21
3.2 Bioma Maranhense	23
3.3 Família Lamiaceae	24
3.3.1 <i>Marsypianthes chamaedrys</i>	25
4. CAPÍTULO II	28
Potencial leishmanicida de espécies da família Lamiaceae: aspectos químicos e biológicos de constituintes não voláteis	28
1. Introdução	30
2. Metodologia	32
3. Resultados e Discussão	32
3.1 Potencial leishmanicida de extratos e frações de espécies da família Lamiaceae	33
3.2 Potencial leishmanicida de compostos isolados de espécies da família Lamiaceae	41
3.3 Usos etnofarmacológicos das espécies de Lamiaceae no tratamento da leishmaniose	54
4 Considerações finais	55
Referências	56
5. CAPÍTULO III	63
Composição química e atividade leishmanicida de extratos de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Lamiaceae)	63
1. Introdução	65
2. Metodologia	66
2.1 Procedimento experimental geral	66
2.2 Material vegetal	66
2.3 Preparação do extrato etanólico das folhas de <i>M. chamaedrys</i>	66
2.4 Partição do extrato etanólico de folhas de <i>M. chamaedrys</i>	67
2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE – DAD	67
2.6 Ensaios <i>in vitro</i>	67
2.6.1 <i>Parasitas e culturas de células</i>	68

2.6.2	<i>Ensaio nas formas promastigotas</i>	68
2.6.3	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	69
2.7	Análise estatística	69
3.	Resultados e Discussão	69
6	Conclusão	72
	REFERÊNCIAS	73