



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

SANDRA ALVES DE ARAÚJO

**Avaliação do potencial antiparasitário do extrato e frações de *Terminalia catappa*
L. (Combretaceae)**

São Luís - MA

2023

SANDRA ALVES DE ARAÚJO

**Avaliação do potencial antiparasitário do extrato e frações de *Terminalia catappa*
L. (Combretaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária
Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Coorientador: Dr. Fernando Almeida de Souza

São Luís - MA

2023

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

Alves de Araújo, Sandra.

Avaliação do potencial antiparasitário do extrato e frações de Terminalia catappa L. Combretaceae / Sandra Alves de Araújo. - 2023.

99 f.

Coorientador(a): Fernando Almeida de Souza.

Orientador(a): Ana Lucia Abreu Silva.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Alterações morfológicas. 2. Imunomodulação. 3. Leishmania amazonensis. 4. Trypanosoma cruzi. 5. Terminalia catappa. I. Abreu Silva, Ana Lucia. II. Almeida de Souza, Fernando. III. Título.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária – 65080-805, São Luís MA
Telefone 098 3272-9531 – E-mail: renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

Doutoranda: Sandra Alves de Araújo

Título do trabalho: Avaliação do potencial antiparasitário do extrato e frações de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)

Orientadora: Ana Lucia Abreu Silva

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva – UEMA (Presidente)

Profa. Dra. Ana Cláudia Maretti Mira – University of Southern California

Profa. Dra. Flávia de Oliveira Cardoso – IOC/Fiocruz

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho – UFMA

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges – UFMA

Membros suplentes:

Profa. Dra. Kátia da Silva Calabrese – IOC/Fiocruz

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Souza – UNICEUMA

Data da defesa: 31 de outubro de 2023

Horário: 14:00 h

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À professora Dra. Ana Lucia Abreu Silva, pela confiança e orientação neste trabalho;

Ao Dr. Fernando Almeida de Souza, pela coorientação neste trabalho;

Ao professor Dr. Fabio Henrique Evangelista de Andrade;

À professora Dra. Cláudia Quintino da Rocha;

À pesquisadora do IOC/Fiocruz, Dra. Kátia Calabrese da Silva;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO/UFMA;

Aos colegas da turma de doutorado 2019.02;

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Anatomopatologia/UEMA, especialmente Allana Barros, Wendel, Carolina, Leonardo, Carla, Rafael e Clarissa;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia do IOC/Fiocruz;

Aos meus irmãos que o coração escolheu, Marilene, Karla, Jordânia, Aline, Helen, Isaias, Rute, Ananda, Aldilene e Viviane;

À minha família, em especial aos meus pais, Antônio Campos de Araújo e Vânia Roque Alves;

Ao meu amado esposo, Dionatan Thiago Riedel;

À UEMA, meu segundo lar;

À CAPES, pela concessão de bolsa;

À FAPEMA, pelo suporte financeiro.

MUITO OBRIGADA!

“Por trás de alguém que vai longe, existe uma rede de apoio que motiva.”

À minha família!

Dedico.

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo! Não se desanime!”

Deuteronômio 31:8

RESUMO

As leishmanioses e a doença de Chagas são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, respectivamente. Produtos naturais vem sendo utilizados como alternativa ao uso das drogas disponíveis, responsáveis por alta toxicidade e desenvolvimento de resistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico do extrato e frações obtidas de folhas de *Terminalia catappa* sobre os parasitos das espécies *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Folhas de *T. catappa* foram coletadas, secas à temperatura ambiente e trituradas. O material foi submetido à extração com etanol 70% por percolação exaustiva, e denominado extrato hidroetanólico. Posteriormente, o extrato foi diluído em H₂O: MeOH (8:2) e submetido à extração com hexano e acetato de etila, obtendo-se a fração hexânica, a fração acetato de etila e a fração água-metanol. No experimento 1 foram investigadas a ação do extrato e das frações de *T. catappa* sobre o parasito *T. cruzi*, foram analisadas a atividade antioxidante e as alterações ultraestruturais do parasito após o tratamento. A caracterização química do extrato hidroetanólico e da fração acetato de etila realizada por espectrometria de massas identificou a presença de compostos fenólicos. De todos os extratos e frações de *T. catappa* avaliados, a fração acetato de etila e a fração aquosa apresentaram considerável atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (IC₅₀ de 7,77 ± 1,61 e 5,26 ± 1,26 µg/mL, respectivamente) e pelo método de redução de íons férricos (687,61 ± 0,26 e 1009,32 ± 0,13 µM de equivalente Trolox/mg de extrato, respectivamente). A fração acetato de etila apresentou notável atividade inibitória contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* com IC₅₀ de 8,86 ± 1,13; 24,91 ± 1,15 e 85,01 ± 1,21 µg/mL, respectivamente, e não apresentou citotoxicidade para células Vero (CC₅₀ >1.000 µg/mL). O tratamento de epimastigotas com a fração acetato de etila causou alterações ultraestruturais severas como ruptura do citoplasma, desorganização celular, variação na morfologia e perda da integridade do parasito. Conclui-se que a fração acetato de etila obtida das folhas de *T. catappa* pode ser uma alternativa eficaz no tratamento e controle da doença de Chagas, sendo material para futuras investigações. Em seguida, avaliamos o potencial terapêutico de extratos e frações de *T. catappa* sobre *L. amazonensis* e investigamos os mecanismos imunomoduladores responsáveis por essa ação. Os ensaios anti-*Leishmania* mostraram que a fração acetato de etila apresentou atividade contra promastigotas (IC₅₀ 86,07 ± 1,09 µg/mL) e baixa citotoxicidade para células hospedeiras (CC₅₀ 517,70 ± 1,68 µg/mL). Adicionalmente, a fração acetato de etila também inibiu o parasito intracelular (IC₅₀ 25,74 ± 1,08 µg/mL) com índice de seletividade de 20,11. O tratamento com a fração acetato de etila de *T. catappa* não alterou a produção de NO, mas aumentou os níveis de TNF-α e diminuiu a expressão gênica de HO-1 e ferritina em macrófagos estimulados com *L. amazonensis*. O teor total de flavonóides e ácido elágico na fração acetato de etila foi de 13,41 ± 1,86 mg QE/g e 79,25 mg/g, respectivamente. Quanto à ação dos extratos sobre parasitos do gênero *Leishmania*, concluímos que a fração acetato de etila possui atividade leishmanicida e mecanismos imunomoduladores que contribuem para esta ação. Por fim, a fração acetato de etila de *T. catappa* demonstrou propriedades antitripanosomatídeos e antioxidante promissoras para o tratamento e controle da doença de Chagas e a leishmaniose, entretanto, novos estudos são necessários, especialmente em modelos *in vivo* para reforçar nossos achados e contribuir com a elucidação dos mecanismos de ação.

Palavras-chaves: *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, fitoterapia, ácido elágico, alterações morfológicas, imunomodulação, *Terminalia catappa*.

ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease are infectious-parasitic diseases caused by protozoa of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*, respectively. Natural products have been used as an alternative to the available drugs, responsible for high toxicity and development of resistance. Thus, the objective of this work is to evaluate the therapeutic potential of extracts and fractions obtained from *Terminalia catappa* on the parasites of the species *L. amazonensis* and *T. cruzi*. *T. catappa* leaves were collected, dried and powdered. The material was subjected to extraction with 70% ethanol by exhaustive percolation, and denominated hydroethanolic extract. Subsequently, the extract was diluted in H₂O: MeOH (8:2) and subjected to extraction with hexane and ethyl acetate, obtaining the hexane fraction, the ethyl acetate fraction and the water-methanol fraction. In the experiments investigating the action of the extract and fractions of *T. catappa* on the *T. cruzi* parasite, the antioxidant activity, and ultrastructural alterations of the parasite after treatment were analyzed. The chemical characterization of the hydroethanolic extract and the ethyl acetate fraction carried out by mass spectrometry identified the presence of phenolic compounds. From all *T. catappa* extracts and fractions evaluated, the ethyl acetate and the aqueous fraction displayed the best antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical scavenging method (IC₅₀ of 7.77 ± 1.61 and 5.26 ± 1.26 $\mu\text{g/mL}$ respectively), and by ferric ion reducing method (687.61 ± 0.26 and 1009.32 ± 0.13 μM of Trolox equivalent/mg extract, respectively). The ethyl acetate fraction showed remarkable inhibitory activity against epimastigotes, trypomastigotes and intracellular amastigotes of *T. cruzi* with IC₅₀ of 8.86 ± 1.13 , 24.91 ± 1.15 and 85.01 ± 1.21 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and showed no cytotoxicity for Vero cells (CC₅₀ >1000 $\mu\text{g/mL}$). The treatment of epimastigotes with the ethyl acetate fraction induced severe ultrastructural changes such as cytoplasmic disruption, cellular disorganization, morphological variation, and loss of parasite integrity. It is concluded that the ethyl acetate fraction obtained from *T. catappa* leaves can be an effective alternative in the treatment and control of Chagas disease, being material for future investigations. Next, we evaluated the therapeutic potential of *T. catappa* extracts and fractions on *L. amazonensis* and investigated the immunomodulatory mechanisms responsible for this action. Anti-*Leishmania* assays showed that the ethyl acetate fraction exhibited activity against promastigotes (IC₅₀ 86.07 ± 1.09 $\mu\text{g/mL}$) and low cytotoxicity (CC₅₀ 517.70 ± 1.68 $\mu\text{g/mL}$). Additionally, the ethyl acetate fraction also inhibited the intracellular parasite (IC₅₀ 25.74 ± 1.08 $\mu\text{g/mL}$) with a selectivity index of 20.11. Treatment with *T. catappa* ethyl acetate fraction did not increase NO production, but increased TNF- α levels and decreased HO-1 and ferritin gene expression in macrophages stimulated with *L. amazonensis*. The total flavonoid and ellagic acid content for ethyl acetate fraction was 13.41 ± 1.86 mg QE/g and 79.25 mg/g, respectively. As for the action of the extracts on parasites of the genus *Leishmania*, we conclude that the ethyl acetate fraction has leishmanicidal activity and immunomodulatory mechanisms that contribute to its action. Finally, the ethyl acetate fraction of *T. catappa* demonstrated promising antitrypanosomatides and antioxidant properties for the treatment and control of Chagas disease and leishmaniasis, however, further studies are needed, especially *in vivo* models to reinforce our findings, and contribute to the elucidation of the mechanisms of action.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, phytotherapy, ellagic acid, morphological changes, immunomodulation, *Terminalia catappa*.