

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS**

MATHEUS LOPES SILVA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE UMA NEOLIGNANA
ISOLADA DAS FOLHAS DE *Saururus cernuus* L. (Saururaceae)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO




Santo André

2019

MATHEUS LOPES SILVA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE UMA NEOLIGNANA
ISOLADA DAS FOLHAS DE *Saururus cernuus* L. (Saururaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Química, ao Centro de Ciências
Naturais e Humanas da Universidade Federal
do ABC, Santo André.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Santo André
2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lopes Silva, Matheus

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE UMA
NEOLIGNANA DAS FOLHAS DE *Saururus cernuus* L.
(Saururaceae) / Matheus Lopes Silva. — 2019.

44 fls. : il.

Orientador: João Henrique Ghilardi Lago

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,
Bacharelado em Química, Santo André, 2019.

1. Fitoquímica. 2. *Saururus cernuus*. I. Ghilardi Lago, João
Henrique. II. Bacharelado em Química, 2019. III. Título.

Matheus Lopes Silva

Avaliação da atividade antiparasitária de uma neolignana isolada das folhas de *Saururus
cernuus* L. (Saururaceae)

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Química do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC, como requisito à conclusão de curso.

Aprovada em ____ de _____ de 2019

Prof.^a Dr.^a Amedea Barozzi Seabra
Examinador UFABC

Prof. Dr. Robson Macedo Novais
Examinador UFABC

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Orientador

Santo André – SP
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marina Branco Lopes, por sempre me apoiar desde o meu ingresso na UFABC até este momento em que concluo o Bacharelado em Química.

Agradeço à Ms.^a Juliana Ribeiro de Brito pela colossal paciência e por ter se mostrado sempre disposta a ajudar nas atividades do projeto.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Vinícius Londero, Poliana Mendonça Christine Silva, Eric Umehara, Ivanildo Brito, Henrique Barbosa, Fernanda Thevernard, Letícia Lima, Deborah Sessa, Anderson Ueno e Kaio Gomes por me acolherem e me auxiliarem no uso dos equipamentos e protocolos experimentais.

Agradeço ao Prof. Dr. André Tempone e à Dr.^a Thais Costa-Silva pelo trabalho de colaboração dos ensaios biológicos das substâncias estudadas.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Amedea Barozzi Seabra pela disposição em organizar e compor a banca dos trabalhos de conclusão de curso do Bacharelado em Química.

Agradeço ao Prof. Dr. Robson Macedo Novais pelo imenso carinho e por me guiar na arte da escrita e produção científica.

Agradeço ao Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago por me receber em seu grupo de pesquisa, pela orientação concedida e as valiosas conversas sobre o trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos nossos projetos de pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal do ABC, em especial ao corpo docente do Bacharelado em Química, pelos ensinamentos até aqui adquiridos e que me constituíram como pesquisador.

RESUMO

A doença de Chagas e a Leishmaniose visceral constituem parte das chamadas doenças tropicais negligenciadas. Entendidas como um grave problema de Saúde Pública, estando intimamente atrelada a realidade socioeconômica dos países que se encontram nas regiões tropicais do planeta. Recentes estimativas mostram que um em cada sete pessoas no mundo está em risco de contaminação por este grupo de doenças. Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas e da Leishmaniose foram desenvolvidos na década de 60 e, além de serem extremamente tóxicos, também apresentam baixa eficácia de tratamento. Neste cenário, se faz necessário a busca por terapias alternativas. Dessa forma, este trabalho buscou isolar um composto isolado de *Saururus cernuus* L e avaliar sua potencialidade como fármaco. Por meio de técnicas cromatográficas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi isolado o composto *treo*-austrobailignana-5, cuja ação antileishmanial e antitripanosoma foi avaliada *in vitro*. Os ensaios biológicos indicaram que o composto isolado se mostrou moderadamente ativo frente às formas promastigotas do parasita *Leishmania (L.) infantum*, apresentando CE₅₀ correspondente a $87,3 \pm 13,6 \mu\text{M}$, com IS igual ou superior a 2,3. Ainda que o composto isolado tenha se mostrado inativo frente às formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, bem como tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o mesmo apresentou menor citotoxicidade frente a células de mamíferos quando comparado com o fármaco padrão miltefosina. Deste modo, os resultados deste trabalho permitem inferir que o composto pode ser utilizado como ponto de partida para estudos posteriores de modificações estruturais que visem proporcionar atividade biológica significativa frente às doenças tropicais negligenciadas.

Palavras-chave: Fitoquímica, *Saururus cernuus*, quimioterápico, doenças tropicais negligenciadas, neolignanais

ABSTRACT

Chagas disease and visceral Leishmaniasis are part of what it has been called neglected tropical diseases – a group of diseases which is deeply tied to the social and economic reality of the Southern hemisphere countries. Estimates show that one out of seven people in the world are in danger of being contaminated by a disease of this group. Developed in the late 60s, the only medicine available for the treatment of Chagas disease and Leishmaniasis are extremely toxic and not so much efficient. Thus, it is urgent the research for new prototypes of drugs as neglected tropical diseases becomes a problem of Public health. Medicinal plants such as *Saururus cernuus* L., are known to be great source of potential bioactive molecules. In this scenario, this work sought the isolation and characterization of *treo*-austrobailgnan-5, through chromatographic techniques and ^1H ^{13}C NMR. This compound was isolated from *Saururus cernuus*. *In vitro* biological testing indicated that *treo*-austrobailgnan-5 was moderately active for promastigotes forms of *Leishmania (L.) infantum* and not active for amastigotes forms of the previous one and tripomastigotes and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* parasites. However, *treo*-austrobailgnan-5 has shown less cytotoxicity in comparison with the standard medicine miltefosine. In conclusion, we can infer that *treo*-austrobailgnan-5 may be used as a starting point for new studies on molecular modification for the development of new active drugs against the neglected tropical diseases.

Key-words: Phytochemistry, *Saururus cernuus*, chemical medicine, neglected tropical diseases, neolignans

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	3
Figura 2. Estrutura química do glucantime (à esquerda) e do pentostam (à direita).	4
Figura 3. Ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 4. Estruturas químicas do benzonidazol (à esquerda) e do nifurtimox (à direita).	6
Figura 5. Estados do Brasil afetados pela transmissão da doença de Chagas em via oral (em laranja).	7
Figura 6. Foto da espécie <i>Saururus cernuus</i>	8
Figura 7. Estrutura química da <i>treo</i> -austrobailignana-5, uma neolignana.	9
Figura 8. Biossíntese da <i>treo</i> -austrobailignana-5.	9
Figura 9. Esquema de partição líquido-líquido do extrato metanólico.....	15
Figura 10. Estrutura química da <i>treo</i> -austrobailignana-5	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos bioativos isolados da <i>S. cernuus</i> frente à <i>L. amazonensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Tabela 2. Grupos formados após o fracionamento do extrato hexânico.....	16
Tabela 3. Grupos formados após o fracionamento da fração FH-A	17
Tabela 4. Grupos formados após o fracionamento da fração FH-A1	17
Tabela 5. Dados espectroscópios de RMN de ^1H do composto isolado (δ , 300 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (BRITO et al., 2018).....	24
Tabela 6. Dados espectroscópios de RMN de ^{13}C do composto isolado (δ , 75 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (BRITO et al., 2018).....	24
Tabela 7. Efeito antiparasitário do composto isolado <i>treo</i> -austrobailignana-5 frente a <i>Leishmania infantum</i>	25
Tabela 8. Efeito antiparasitário do composto isolado <i>treo</i> -austrobailignana-5 frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Tabela 9. Influência da substituição dos anéis aromáticos de neolignanas isoladas de <i>Saururus cernuus</i>	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de Etila

CC – Cromatografia em coluna

CC₅₀ – Concentração Citotóxica a 50%

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CE₅₀ – Concentração Efetiva a 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

d – Duplete

dd – Duplo duplete

ddl – Duplo duplete largo

FH – Fase hexânica

Hz – Hertz

J – Constante de acoplamento

m - Multiplete

mult. - Multiplicidade

MeOH – Metanol

mg – Miligramas

MHz – Megahertz

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

s – Simpleto

t - Tripleto

t_R – Tempo de Retenção

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

δ – Deslocamento Químico (ppm)

λ – Comprimento de onda (nm)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Química dos Produtos Naturais	1
1.2 Doenças tropicais negligenciadas	2
1.2.1 Leishmaniose visceral	2
1.2.2 Doença de Chagas	4
1.3 A espécie <i>Saururus cernuus</i> L.	8
1.4 Lignanas e neolignanas	8
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Equipamentos	13
3.1.2 Câmara UV	13
3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	13
3.2 Materiais	13
3.2.1 Solventes	13
3.2.2 Materiais Cromatográficos	14
3.2.3 Material vegetal	14
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	15
4.1 Extração	15
4.2 Fracionamento cromatográfico	15
4.3 Ensaio biológico frente ao parasita <i>Leishmania (L.) infantum</i>	18
4.3.1 Parasitas	18
4.3.2 Células de mamíferos	18
4.3.3 Determinação do potencial frente a <i>L. (L.) infantum</i> - promastigotas	18
4.3.4 Determinação da potencial frente <i>L. (L.) infantum</i> – amastigotas intracelulares	19
4.3.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos	19
4.3.6 Análise estatística	20
4.4 Ensaio biológico frente ao parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
4.4.1 Parasitas	20
4.4.2 Células de mamíferos	20
4.4.3 Determinação do potencial frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> - tripromastigotas	21
4.4.4 Determinação do potencial frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> - amastigotas	21
4.4.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos	22
4.4.6 Análise estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Identificação estrutural	23
5.1.1 Identificação estrutural da <i>treo</i> -austrobailignana-5	23
5.2 Ensaio de atividade biológica	25
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Química dos Produtos Naturais

Desde o surgimento das grandes civilizações, o ser humano busca por formas de tratamento frente a abundância de agentes patogênicos como bactérias, vírus e parasitas que competem contra o sistema imunológico causando uma gama de enfermidades que nos acometem até hoje. Frente a essas doenças, o uso dos produtos naturais surge como uma primitiva prática da medicina, conforme destaca Viegas et al. (2006, p. 326):

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. [...] até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos.

Produto natural é todo o tipo de substância produzida pela natureza por intermédio dos seres vivos. De acordo com Cooper e Nicola (2015), os produtos naturais podem ser classificados em metabólitos essenciais, substâncias que estão diretamente envolvidas no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos seres vivos, tais como: produtos de fermentação (etanol, ácido acético, cítrico e láctico) e constituintes celulares (lipídeos, vitaminas e polissacarídeos). E, metabólitos especiais, substâncias que não estão diretamente envolvidas nos processos vitais, tais como: antibióticos, pigmentos, carotenoides, etc. São classificados como produtos naturais de interesse, as substâncias que possuam alto valor agregado a partir de suas características estruturais.

De acordo com Berlinck et al. (2017), foi o surgimento de ferramentas de análise espectroscópica que permitiu um grande avanço na elucidação do universo dos metabólitos especiais das plantas. Dessa forma, é possível uma discussão mais aprofundada de como características estruturais de biomoléculas estariam associadas às suas funções no tratamento de doenças, consolidando o campo do saber científico hoje conhecido como a Química dos Produtos Naturais. Nesse cenário, o Brasil aparece com um imenso potencial na pesquisa deste campo, conforme aponta Bolzani (2016, p. 4):

O Brasil, detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta, não pode se orgulhar de uma bioeconomia vigorosa e baseada em inovações a partir da sua rica biodiversidade - uma fábrica natural sofisticada de substâncias de classes diversas e estruturas químicas inusitadas que teria, se bem aproveitada, um potencial enorme para inovações radicais e incrementais para os setores de fármacos, cosméticos, fragrâncias, agroquímicos e suplementos alimentares.

Em uma época de constante preocupação frente às doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose, a doença de Chagas e a malária, a Química de Produtos Naturais

emerge como aliada na procura de substâncias com potencial citotóxico e antiparasitário, de caráter terapêutico, que auxiliem no combate a essas enfermidades (DIAS et al., 2013; BRITO, 2018).

1.2 Doenças tropicais negligenciadas

A Leishmaniose e a doença de Chagas são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como *doenças tropicais negligenciadas* (DTNs) – tropicais, por serem endêmicas das regiões de clima tropical e subtropical e, negligenciadas, por haver menor destinação de recursos para a erradicação e cura das mesmas. As últimas estimativas apontam que 1 em cada 7 pessoas no mundo, pode estar afetada por uma DTN (LINDOSO, 2009; ACHARAYA et al., 2017).

Neste cenário, direcionamos nossa pesquisa na busca por novas terapias frente à leishmaniose e à doença de Chagas, esta última considerada por muitos autores como a mais negligenciada de todas as doenças tropicais (PEREIRA e NAVARRO, 2013; DIAS et al., 2016).

1.2.1 Leishmaniose visceral

Leishmaniose é o nome dado ao conjunto de doenças associadas aos agentes etiológicos parasitários do gênero *Leishmania*, protozoários que, em geral, são transmitidos por mosquitos flebotomíneos¹. Das formas mais comuns de Leishmaniose podemos citar: a Leishmaniose tegumentar americana e a Leishmaniose visceral (BRASIL, 2017).

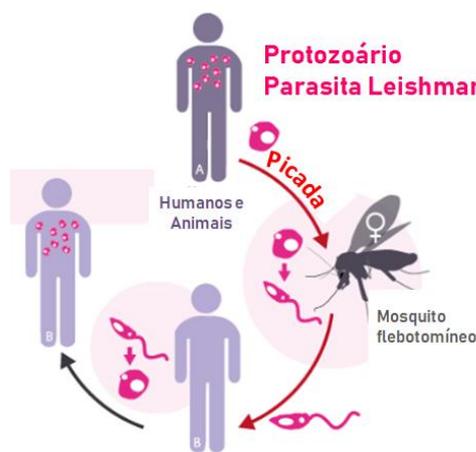
Somente no Brasil, seis espécies diferentes de *Leishmania* já foram identificadas bem como mais de 200 espécies de flebotomíneos. No período de 1985 a 2003, cerca de 524 mil casos foram registrados no país, com grande prevalência nas regiões Norte e Nordeste (BASANO e CAMARGO, 2004). Dados mais recentes apontam uma incidência de dois casos por 100.000 habitantes por ano (BARRETO et. al, 2015).

O parasita se manifesta em duas formas: a extracelular (promastigota) e a intracelular (amastigota) que se intercalam dentro do hospedeiro. O repasto sanguíneo do mosquito flebotomíneo fêmea injeta formas promastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro. Na ferida da picada, o sistema imunológico ativa macrófagos para fagocitarem as formas

¹ Phlebotominae: uma subfamília de insetos da família dos Psychodidae

promastigotas. Dentro da célula, os promastigotas se transformam em amastigotas que conseguem se multiplicar por divisão celular, rompendo a membrana e destruindo o macrófago no processo. As novas células amastigotas passam a infectar todo o sistema reticuloendotelial. A picada pelo vetor também carrega formas amastigotas da corrente sanguínea do hospedeiro infectado para o mosquito, no qual se tornam promastigotas, reiniciando assim o ciclo, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1. Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*.



Fonte: OMS, 2019 (adaptado).

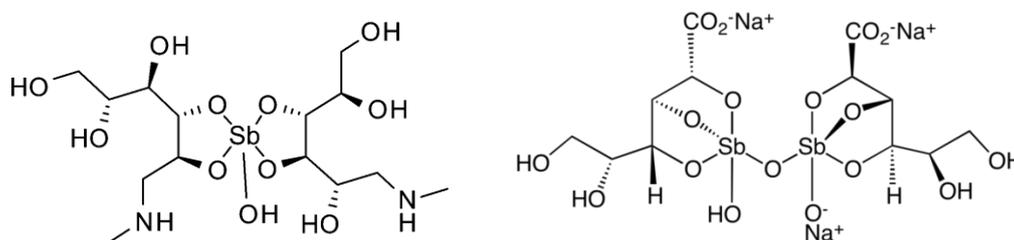
Ocasionalmente pela espécie *Leishmania infantum*, a leishmaniose visceral é caracterizada pela infecção do fígado, do baço e da medula óssea levando, na maioria dos casos, à morte. O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é, no Brasil, o principal reservatório de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo o mosquito hematófago *Lutzomyia longipalpis* o seu principal vetor (WERNECK, 2016; GOTIJO & MELO, 2004).

Entendida pela OMS como doença tropical negligenciada, a leishmaniose visceral tem panorama endêmico em seis países que acumulam somados 90% dos casos: Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia. As últimas estimativas apontam que 200 a 400 mil novos casos de *Leishmania* visceral surjam a cada ano, com uma frequência de 10% evoluindo para óbito (WERNECK, 2016).

Desenvolvidas há mais de 60 anos, os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose visceral são os antimoniais pentavalentes como o antimoniato de metil glucamina (glucantime) e o estibogluconato de sódio (pentostam), cujas estruturas químicas estão descritas na Figura 2. A toxicidade da bioacumulação de antimônio que acarreta em

doenças no fígado, na pele e principalmente nos aparelhos respiratório e cardiovascular (ZHENG et al., 2015). Além disso, o surgimento de formas do parasita resistentes aos fármacos antimoniais no Sudão (GOTIJO e MELO, 2004) corroboram pela urgência do desenvolvimento de novos fármacos frente à esses que a cada dia se mostram menos efetivos.

Figura 2. Estrutura química do glucantime (à esquerda) e do pentostam (à direita).



Fonte: autoria própria (ChemDraw®).

Não obstante, outra moléstia que urge por pesquisa em novas estratégias terapêuticas é a doença de Chagas, que, assim como a Leishmaniose, também é caracterizada pela OMS (2019) como doença tropical negligenciada.

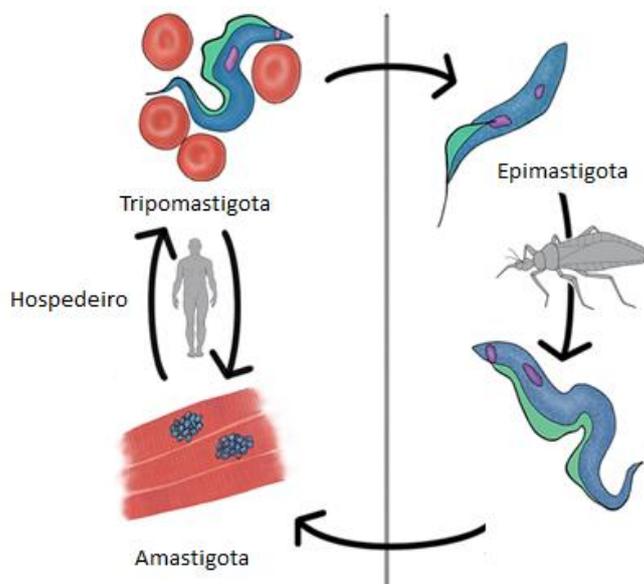
1.2.2 Doença de Chagas

Descrita em 1909 pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas – também conhecida como Tripanossomíase americana – é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Dados mais recentes apontam que haja em torno 6 a 10 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi* e que cerca de 70 milhões estejam vivendo em áreas de alto risco de transmissão (DIAS et al., 2016; PINHEIRO et al., 2017; WHO, 2018), em função das condições climáticas que favorecem a reprodução dos insetos vetores, em sua maioria do gênero *Triatoma*. No Brasil, o inseto barbeiro (*Triatoma infestans*) é apontado como o vetor mais comum de transmissão (PEREIRA e NAVARRO, 2013).

O protozoário *T. cruzi* é transmitido para o ser humano no momento da picada do inseto hematófago infectado que defeca após a ingestão do sangue no local da mordida. O parasita então consegue penetrar na corrente sanguínea por meio da ferida causada pela picada ou pela coceira que o “empurra” para dentro (PEREIRA e NAVARRO, 2013; ALEXANDRE et al., 2014). Já dentro do hospedeiro humano, o parasita intercala entre as formas amastigota e tripomastigota (flagelado), sendo esta última característica da fase crônica da doença, marcada pela invasão do parasita no sistema circulatório e linfático.

Formas amastigotas presentes no sistema circulatório de um hospedeiro infectado podem ser retiradas pela picada do barbeiro, contaminando o inseto, assim garantindo a reprodução do ciclo (DIAS et al., 2016) conforme esquematizado na Figura 3 a seguir.

Figura 3. Ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: adaptado de Atwood et al. (2005).

Dessa forma, é necessário desenvolver medicamentos que sejam atuantes tanto nas formas amastigotas quanto nas formas tripomastigotas do parasita de forma a coibir a retransmissão do parasita para o inseto, bem como promover a morte celular das formas tripomastigotas.

Os sintomas iniciais da doença de Chagas são pouco específicos, se confundindo muito com os sintomas da Dengue ou com os da gripe comum. De acordo com Alexandre et al. (2014, p. 92), na fase aguda da doença:

Alguns sintomas podem estar presentes como febre, astenia, inapetência e cefaleia, sintomas esses que desaparecem de quatro a oito semanas na maioria dos indivíduos acometidos e que são comuns de outras doenças infecciosas [...].

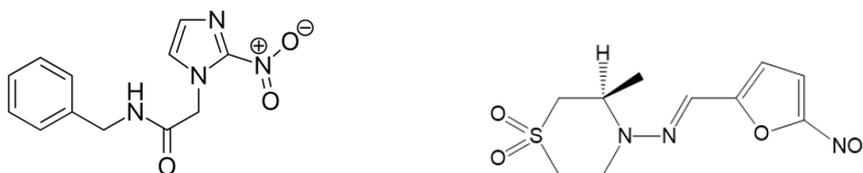
Os autores ainda grifam os sinais clínicos característicos da doença de Chagas tais como o sinal de Romaña (inflamação das pálpebras) e o chagoma de inoculação (inchaço cutâneo observado no local da picada). Já na fase na crônica, quando manifestada, se inicia em cerca de 10 a 20 anos após a infecção, e leva a complicações no sistema cardiovascular e digestivo e depressão da medula óssea. Com um alto índice de mortalidade em função de

falência cardíaca e danos no sistema de condução (ALEXANDRE et al., 2014; BERN et al., 2007;).

Portanto, tendo em vista o panorama clínico da doença de Chagas, é inadiável a discussão das estratégias terapêuticas existentes frente a esta patologia.

Desenvolvidos na década de 60, os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são o benzonidazol e nifurtimox, cujas estruturas químicas estão descritas na Figura 4. Ambos na fase aguda apresentam cerca de 60-80% de eficácia, manifestando no entanto, efeitos colaterais graves (PINHEIRO et al., 2017; BARCELLOS, 2018), tais como anorexia e perda de peso, polineuropatia, náusea, vômito e vertigem (FORSYTH, 2016), sendo muitas vezes administradas em conjunto com drogas imunossupressoras, o que leva o paciente de um estado já debilitado a um estado de maior risco para doenças oportunistas (NISHIOKA, 2000).

Figura 4. Estruturas químicas do benzonidazol (à esquerda) e do nifurtimox (à direita).



Fonte: autoria própria (ChemDraw®).

Tendo o nifurtimox sido descontinuado nos anos 80, o benzonidazol é atualmente a única droga disponível no Brasil para o tratamento da doença de Chagas (PONTES et al, 2010, ALEXANDRE et al., 2014). O estudo de Pontes et al. (2010) revelou que de 30 a 60 dias de tratamento, 87,5% dos pacientes tratados com benzonidazol apresentaram prurido (coceira), formigamento, fraqueza muscular e erupção cutânea.

Dados epidemiológicos do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2015), apresentam o número de 12 mil vítimas fatais da doença de Chagas na América Latina no ano de 2010. A projeção para o ano de 2020 é de que entre 1,3 milhões a 3,2 milhões de pessoas estejam infectadas no Brasil, das quais 409 mil a 963 mil estarão na fase crônica da doença. Não obstante, de 2006 para 2010 a população em risco de infecção da doença de Chagas aumentou de 28 milhões em 2006 para 70,2 milhões em 2010.

As estimativas alarmantes para o número de infectados com a doença de Chagas também estão relacionadas com a transmissão oral da doença por meio de alimentos

contaminados. Pereira et al. (2009) apontam que no período de 2005 a 2009, episódios de surtos da doença em Santa Catarina, na região Norte e na Venezuela estão associados ao consumo de açaí (*Euterpe oleracea* M.), na medida em que o *Trypanosoma cruzi* sobrevive na polpa da fruta em uma faixa de -20° a 4° C, correspondente às temperaturas padrões da maioria das geladeiras convencionais.

A Figura 6 mostra os estados que já registraram casos de doença de Chagas transmitida por via oral. Em revisão bibliográfica sobre a transmissão oral da doença, Ferreira et al. (2014), realçam como o desafio da vigilância sanitária do consumo de alimentos nas regiões periféricas do país circundam este problema.

Figura 5. Estados do Brasil afetados pela transmissão da doença de Chagas em via oral (em laranja).



Fonte: Pereira et al. (2009), adaptado.

A partir deste preocupante conjuntura que se encontra a leishmaniose e a doença de Chagas, pesquisadores do campo da Química de Produtos Naturais se mobilizaram nos últimos dez anos a encontrar novas estratégias terapêuticas por meio do isolamento de moléculas bioativas presentes nos extratos de plantas que apresentaram atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania infantum* (GRECCO, 2012; UENO, 2017; BARCELLOS, 2018; CONSERVA et al., 2018). Dentre essas plantas, destaca-se a espécie *Saururus cernuus*, cujos estudos mais recentes têm apresentado valores interessantes de índice de seletividade frente a esses parasitas e células tumorais (BRITO, 2018; BRITO et al., 2018).

1.3 A espécie *Saururus cernuus* L.

A família Saururaceae é uma família de plantas herbáceas constituída por quatro gêneros: *Saururus*, *Gymnotheca*, *Anemopsis* e *Houttuynia*. Tem sua ocorrência natural leste na América do Norte e extremo oriente asiático (GRÍMSSON et al., 2017; LIANG, 1995 apud Meng et al., 2016). Contudo, apesar de não ser endêmica do Brasil, pode ser encontrada na mata atlântica, ocorrendo na região Sudeste nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Nesta família destaca-se a espécie *Saururus cernuus* L. em função de sua atividade antitumoral e antiparasitária atribuída a neolignanas extraídas de suas folhas secas (BRITO, 2018). A Figura 7 mostra folhas utilizadas no processo de extração descrito neste trabalho (cf. item 3.2.3).

Figura 6. Foto da espécie *Saururus cernuus*.



Fonte: Brito (2018).

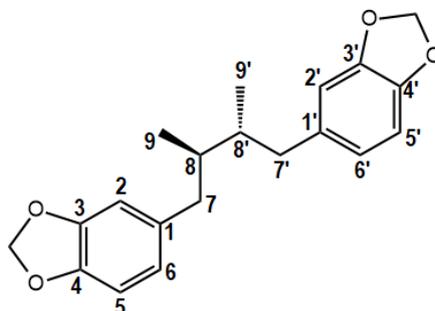
1.4 Lignanas e neolignanas

Lignanas e neolignanas são grupos de metabólitos especiais derivados da rota biossintética do ácido chiquímico. Caracterizadas por uma estrutura dimérica constituída por duas unidades de fenilpropanos, apresentando diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos e na cadeira lateral, lignanas e neolignanas se veem presentes em várias famílias de vegetais, destacando-se a Saururaceae e Piperaceae (TEPONNO et al., 2016). É extremamente sutil a diferença estrutural entre lignanas e neolignanas: são consideradas lignanas as moléculas que:

- a) apresentam a estrutura dimérica propilbenzílica;
- b) apresentam uma ligação entre os carbonos C-8 C-8'.

As que não apresentam esta ligação C-8 C8', mas que apresentam a estrutura dimérica característica das lignanas, são chamadas de “neolignanas”, como mostra a Figura 8 abaixo (TEPONNO et al., 2016).

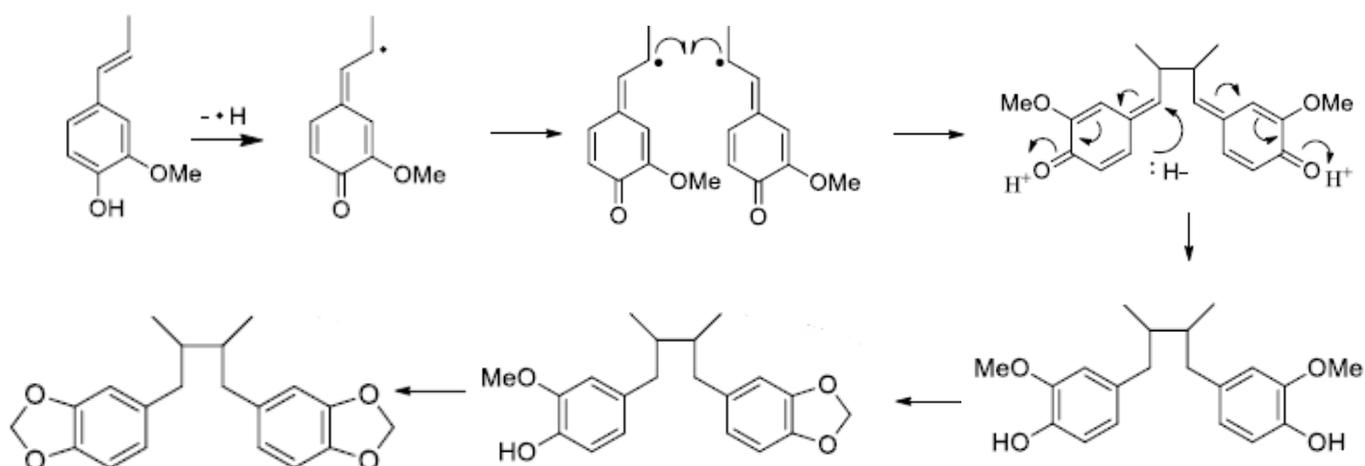
Figura 7. Estrutura química da *treo*-austrobailignana-5, uma neolignana.



Fonte: autoria própria (ChemDraw®).

Proposta por Gottlieb, outra definição para lignanas e neolignanas é seguida por nosso grupo de pesquisa (Química Bioorgânica, UNIFESP/UFABC). Sendo as lignanas entendidas como substâncias diméricas formadas pelo álcool coniferílico como precursor e neolignanas formadas a partir de precursores alil ou propenilfenóis (GOTTLIEB e YOSHIDA, 1984 apud Brito, 2018). A Figura 9 abaixo descreve o processo de biossíntese da *treo*-austrobailignana-5 a partir do isoeugenol.

Figura 8. Biossíntese da *treo*-austrobailignana-5.



Fonte: Brito (2018), adaptado.

Zálešák et al. (2019) estimam que haja de 20-30.000 compostos dentro da classe das lignanas e neolignanas, dos quais apenas 6.000 são atualmente conhecidos. Em vista disso, muitos estudos também vêm apontando a atividade biológica de lignanas e neolignanas frente as mais diversas patologias, em especial ao câncer e à doença de Chagas (DE SOUSA, 2017; BRITO et al., 2018).

No estudo de Brito (2018), que buscou a caracterização estrutural e a avaliação do potencial antiparasitário e citotóxico de metabólitos isolados das folhas de *S. cernuus* a partir de sua fração acetato de etila no extrato metanólico, duas neolignanas, elencadas na Tabela 1 abaixo, se mostraram biologicamente ativas frente à *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 1. Compostos bioativos isolados da *S. cernuus* frente à *L. amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Composto	Estrutura química	Atividade Biológica
<i>treo</i> -austrobailignana		<i>T. cruzi</i>
ácido <i>treo</i> -dihidroguiarético		<i>T. cruzi</i>
<i>treo-treo</i> -manassatina A		<i>L. amazonensis</i>
<i>treo-eritro</i> -manassatina A		<i>L. amazonensis</i>

Fonte: Brito (2017).

O ácido *treo*-dihidroguiarético apresentou valores de concentração efetiva (CE₅₀) igual a 7,00 ± 3,6 µM para a forma tripomastigota e 16,2 ± 3,2 µM para a forma amastigota,

com uma concentração citotóxica (CC_{50}) associada igual a >200 configurando um índice de seletividade (IS) igual ou superior a 28,6 para a forma tripomastigota e igual ou superior a 12,4 para a forma amastigota. Em comparação com o fármaco padrão benzonidazol, o composto ácido *treo*-dihidroguiarético apresentou um índice de seletividade correspondente 78,6% do fármaco padrão frente à forma tripomastigota e igual índice de seletividade frente à forma amastigota (BRITO, 2018) na mesma comparação.

A *treo-treo*-manassatina A apresentou valores de concentração efetiva (CE_{50}) igual a $35,4 \pm 7,7 \mu\text{M}$ para a forma promastigota e $20,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$ para a forma amastigota, com uma concentração citotóxica (CC_{50}) associada igual a $96,3 \pm 15,3 \mu\text{M}$ configurando um índice de seletividade (IS) igual a 2,72 para a forma promastigota e 4,72 para a forma amastigota. Por outro lado, a *treo-eritro*-manassatina A apresentou valores de concentração efetiva (CE_{50}) igual a $17,6 \pm 4,2 \mu\text{M}$ para a forma promastigota e $16,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$ para a forma amastigota, com uma concentração citotóxica (CC_{50}) associada igual a $99,5 \pm 6,5 \mu\text{M}$ configurando um índice de seletividade (IS) igual a 5,59 para a forma promastigota e 6,22 para a forma amastigota. Em comparação com o fármaco padrão miltefosina, o composto *treo-eritro*-manassatina A apresentou um aumento de 24,2% no índice de seletividade frente à forma promastigota e 106% frente à forma amastigota (Ibid).

Tendo em vista os resultados promissores obtidos na avaliação da ação antiparasitárias destas lignanas, justifica-se buscar nos demais fracionamentos do extrato da *S. cernuus* demais metabólitos secundários que possam apresentar atividade antiparasitária. Com essa prerrogativa, a partir da presença de sinais característicos de lignanas na fase hexânica do extrato metanólico, buscou-se neste trabalho estudar o isolamento de outro composto, na hipótese de que este apresentasse atividade antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, contribuindo dessa forma a novas descobertas no campo da Química dos Produtos Naturais e no desenvolvimento de protótipos moleculares ativos frente às Doenças Tropicais Negligenciadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo o isolamento e caracterização estrutural do composto majoritário da fase hexânica do extrato metanólico das folhas da espécie vegetal *S. cernuus*, por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Após o isolamento e caracterização, o composto isolado será avaliado frente atividade antiparasitária, em relação a *L. infantum* e *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Preparação da fase hexânica do extrato metanólico das folhas do vegetal por meio de partição solvente-solvente;
- ❖ Fracionamento e purificação da substância empregando sucessivas técnicas cromatográficas;
- ❖ Caracterização estrutural das substâncias isoladas por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- ❖ Avaliação da atividade antiparasitária (*L. infantum* e *T. cruzi*) da substância isolada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

3.1.1 Moagem

A moagem das folhas foi realizada em um liquidificador comercial Walita®, modelo RI2094/01/A, 110-220V ~60 Hz, 600-750W. A concentração dos extratos e frações foi realizada em um evaporador rotativo da marca Büchi, modelo R-215, munido de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710.

3.1.2 Câmara UV

As revelações foram feitas em câmara UV Spenser com comprimento de onda ajustável em 254 e 365 nm.

3.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) foram obtidos por meio do equipamento Bruker Ultrashield 300 Avance III, operando a 300 MHz e 75 MHz, no Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - UNIFESP em colaboração com a Ms.^a Juliana Ribeiro de Brito.

3.2 Materiais

3.2.1 Solventes

Para os processos de extrações, eluições cromatográficas de colunas e placas foram utilizados solventes das marcas Casa Americana® (MeOH, n-Hexano, AcOEt, CHCl_3 , DCM e Acetona). As análises espectroscópicas de RMN foram preparadas utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) da Cambridge Isotope Laboratories® e TMS como padrão de referência

3.2.2 Materiais Cromatográficos

A coluna cromatográfica (CC) gravitacional utilizada foi preparada com fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,200 mm - Merck®). Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) e preparativa (CCDC), foram utilizadas para a fase estacionária cromatofolhas de sílica gel 60, nas dimensões 20x20 cm de espessura 0,1 mm Macherey-Nagel®.

3.2.3 Material vegetal

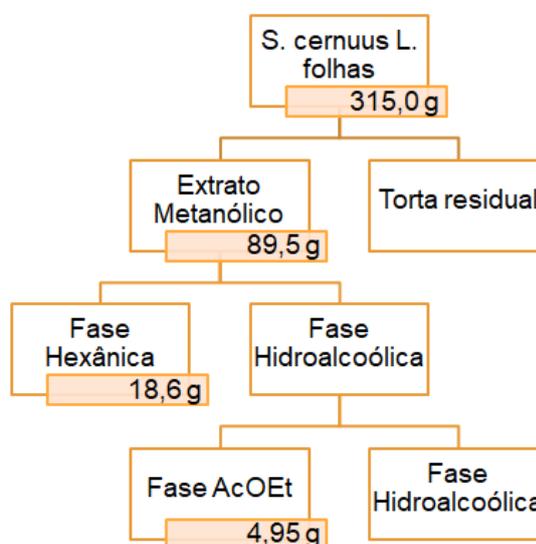
O material vegetal foi adquirido junto a um produtor de plantas ornamentais para aquários e lagos artificiais na cidade de Suzano, SP (coordenadas: latitude 23° 34' 21,81'', longitude 46° 18' 55,69''), e identificado pelas Prof.^a Dr.^a Fatima Otavina de Souza Buturi, da Universidade São Judas Tadeu, e Prof.^a Dr.^a Oriana Aparecida Fávero da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Uma exsicata foi depositada no herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob o registro E.A. Ferreira – 001.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Extração

As folhas foram secadas em estufa a 40 °C por 24 horas, sendo em seguida moídas em liquidificador comercial. Desse processo foram obtidos 315,0 g de material seco que foram extraídos exaustivamente com MeOH. Após evaporação sob pressão reduzida foram obtidos 91,5 g. Parte deste material foi submetido a partição líquido-líquido (17 × 300 mL), obtendo-se assim a fase hexânica. A fase hidroalcoólica residual foi novamente submetida a partição líquido-líquido com AcOEt. O excesso de solvente de ambas as partes foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo. A Figura 10 abaixo representa o esquema de partições.

Figura 9. Esquema de partição líquido-líquido do extrato metanólico



Fonte: autoria própria

4.2 Fracionamento cromatográfico

A fase hexânica foi submetida a cromatografia em camada delgada (CCD), com intuito de verificar qual o sistema de solvente mais adequado para a separação dos compostos presentes. Definindo o melhor sistema, 9,0 g da fase hexânica foi submetida a fracionamento por meio de coluna aberta (5 cm de diâmetro por 60 cm de altura), utilizando como fase estacionária 100 g de sílica gel. Como fase móvel foram utilizadas misturas de

Hexano:AcOEt nas proporções 9:1, 8:2, 6:4, 1:1, 4:6 e 8:2 e AcOEt:MeOH (7:3, 4:6, 1:1, 8:2), finalizando com 100% de MeOH. Esse processo forneceu 155 frações de 15 mL que foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Após a revelação sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), as frações foram reunidas de acordo com a similaridade em que as substâncias se dispuseram por meio de manchas na placa. Desta forma, foi possível obter 14 grupos (A – N) conforme descrito na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Grupos formados após o fracionamento do extrato hexânico

Grupos	Frações	Massa (mg)
FH-A	1-5	1806,8
FH-B	6-11	334,6
FH-C	12-20	670,6
FH-D	21-28	553,0
FH-E	29-37	1567,4
FH-F	38-48	530,9
FH-G	49-55	759,6
FH-H	56-68	275,7
FH-I	69-81	148,3
FH-J	82-102	615,6
FH-K	103-115	1042,3
FH-L	116-128	300,1
FH-M	129-133	21,3
FH-N	134-155	115,6

Fonte: autoria própria.

Seguidamente, todos os grupos foram submetidos a análises espectrais de RMN de ^1H , e devido a presença de sinais característicos de neolignanas, o grupo FH-A foi escolhido para ser novamente fracionado. Dessa forma, 1,8 g do grupo FH-A foi submetido a fracionamento por meio de coluna aberta (5,5 cm de diâmetro por 30 cm de altura), utilizando como fase estacionária 100 g de sílica gel. Como fase móvel foram utilizadas misturas de Hexano:AcOEt nas proporções 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, finalizando com 100% AcOEt, em seguida

foi utilizada a mistura AcOEt:MeOH nas proporções 7:3 e 1:1, finalizando com 100% de MeOH, conforme mostrado na Tabela 03 a seguir. Esse processo forneceu 60 frações de 15 mL que foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Após a revelação sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), as frações foram reunidas de acordo com a similaridade em que as substâncias se dispuseram por meio de manchas na placa. Desta maneira, foi possível obter 6 Subgrupos (FH-A1 – FH-A6) conforme descrito na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Grupos formados após o fracionamento da fração FH-A

Subgrupos	Frações	Massa (mg)
FH-A1	1-21	1279,9
FH-A2	22-27	6,8
FH-A3	28-36	11,3
FH-A4	37-55	19,2
FH-A5	56-70	7,1
FH-A6	71-85	16,0

Fonte: autoria própria.

O Subgrupo FH-A1 revelou-se composto por uma mistura e foi submetido a mais uma etapa de purificação por meio de cromatografia em camada delgada preparativa em sílica gel (7:3 Hexano:AcOEt), rendendo os grupos FH-A1a – FH-A1d, conforme descrito na Tabela 4 a seguir. A amostra FH-A1c foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C sendo possível inferir que a mesma estava pura.

Tabela 4. Grupos formados após o fracionamento da fração FH-A1

Grupos	Massa (mg)
FH-A1a	11,8
FH-A1b	19,8
FH-A1c	22,7
FH-A1d	3,1

Fonte: autoria própria.

As demais frações não foram estudadas em função da presença de material graxo reveladas no espectro de RMN de ^1H . O Anexo 01 apresenta um esquema de todo o fracionamento da fase hexânica bem como a purificação das frações e obtenção do composto isolado.

4.3 Ensaio biológico frente ao parasita *Leishmania (L.) infantum*

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz em colaboração com o pesquisador Dr. André Gustavo Tempone Cardoso (IAL) e Dr.^a Thais Alves da Costa-Silva (UFABC).

4.3.1 Parasitas

Formas promastigotas isoladas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), foram preservadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro de bezerro e 0,25% de hemina a 24°C. Formas amastigotas *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*), sendo colhidas dos baços infectados por centrifugação diferencial (STAUBER et al., 1958).

4.3.2 Células de mamíferos

Macrófagos peritoneais foram recolhidos das cavidades peritoneais de fêmeas de camundongos BALB/c, por meio de lavagem com RPMI-1640, sem indicador de pH (vermelho de fenol), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Células de macaco *Rhesus* (LLC-MK2) foram mantidas em meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol e suplementadas com 10% de soro bovino fetal a 37 °C em incubadora umidificada com CO₂ a 5%. Células murinas conjuntivas (clone NCTC L-929, ATCC) e LLC-MK2 foram mantidas em RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (CORRÊA et al., 2011).

4.3.3 Determinação do potencial frente a *L. (L.) infantum* - promastigotas

De modo a determinar o potencial de concentração efetiva de 50% (CE₅₀) frente a promastigotas de *L. (L.) infantum*, o composto isolado foi dissolvido em DMSO, em seguida

diluído com M-199, sendo adicionado em poços com promastigotas em quantidades de 1×10^6 promastigotas/poço, em placas com 96 poços. A diluição do composto foi realizada de maneira seriada, com concentração inicial de 200 µg/mL. Como parâmetro controle, foi utilizado a miltefosina (1,5 µg /mL), fármaco padrão para o tratamento da Leishmaniose, em MeOH, sendo a análise realizada em duplicata. A placa foi incubada por 24 horas a 24 °C e a viabilidade de promastigotas foi determinada através de suas atividades mitocondriais, por meio de ensaio colorimétrico com MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (TADA et al.,1986).

4.3.4 Determinação da potencial frente *L. (L.) infantum* – amastigotas intracelulares

De modo a determinar a concentração efetiva de 50% (CE₅₀), coletou-se macrófagos peritoneais da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Foram adicionados em placas de 24 poços (Nunc - Thermo) a 37 °C, em seguida se adicionou amastigotas extraídas de baço na proporção 10:1 (amastigota:macrófago) por 24h. Em sequência, foi adicionado o composto isolado, sendo incubado com os macrófagos infectados durante 120 horas a 37 °C. Como padrão de controle, foi utilizada a miltefosina. Posteriormente, foram fixadas as células com metanol, sendo coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. Foi determinada a carga parasitária por meio da razão entre quantidade de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas por macrófago. O composto isolado foi testado com concentração máxima de 200 µM contra o padrão miltefosina. Sendo que foi testado cada ponto em duplicata (YARDLEY, 2010; TEMPONE et al., 2005).

4.3.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos

De modo a determinar a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀), as células NCTC-clone 929 (6×10^4 células / poço) foram semeadas a 4×10^4 células/poço em microplacas de 96 poços e incubadas com o composto isolado por 48 horas a 37 °C em 5% em incubadora de CO₂. O IS foi determinado usando a seguinte relação: CC₅₀ / CE₅₀. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT como descrito anteriormente (TADA et al., 1986).

4.3.6 Análise estatística

Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras duplicadas de dois ensaios independentes. Os valores de CE_{50} foram calculados usando curvas sigmoide dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0 com intervalo de confiança de 95%. O teste de Mann – Whitney foi utilizado para teste de significância (valor de P).

4.4 Ensaio biológico frente ao parasita *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios *in vitro* do composto isolado para avaliação biológica envolvendo o parasita *Trypanosoma cruzi* foram realizados no Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas do Instituto Adolfo Lutz com a colaboração do Dr. André Gustavo Tempone Cardoso (IAL) e da Dra. Thais Alves da Costa Silva (UFABC).

4.4.1 Parasitas

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em células LLC-MK2 (*Rhesus* Monkey Kidney Cells - ATCC CCL 7) em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a temperatura de 37 °C em estufa com 5% CO_2 (KESPER et al., 2000, REIMAO et al., 2010). As formas amastigotas foram obtidas por meio da infecção de macrófagos plaqueados 1×10^5 /poço com formas tripomastigotas na proporção de 5:1 parasitas/macrófagos e incubadas por 4 horas. Os parasitas foram contados em hemacitometro Neubauer e depois aplicados 1×10^6 /poço em placas de 96 poços.

4.4.2 Células de mamíferos

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929 (American Type Culture Collection - ATCC CCL-1), foram fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer a temperatura -70 °C. Posteriormente foram mantidas em meio M-199 suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, sob a temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO_2 (CORREA et al., 2011).

4.4.3 Determinação do potencial frente a *Trypanossoma cruzi* - tripromastigotas

O composto isolado foi dissolvido em DMSO, diluído em meio de cultura em diferentes concentrações e incubado com os parasitas para se determinar as respectivas CE_{50} . Para evitar danos aos parasitas, a concentração do solvente não ultrapassou 0,5%. As substâncias foram diluídas em série utilizando-se meio RPMI-1640 em placas de 96 poços e, em seguida formas tripomastigotas do parasita foram adicionadas na concentração de 1×10^6 parasitas/poço. As placas foram mantidas a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 durante 24 horas. Após esse período, foram adicionados 20 μ L de resazurina a 10% e as placas foram incubadas por mais 20 horas nas mesmas condições para se determinar a viabilidade dos 71 parasitas. Ao final do ensaio, foi realizada a leitura da placa por absorvância em espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm (GEHRKE et al., 2013). Como controle positivo (100% de células mortas), foi utilizado o fármaco padrão benzonidazol e, como controle negativo (100% de células mortas), foram utilizadas as células não tratadas.

4.4.4 Determinação do potencial frente a *Trypanossoma cruzi* - amastigotas

Para avaliar a atividade do composto isolado frente às formas amastigotas do parasita, foram utilizados macrófagos previamente infectados com cultura de tripomastigotas. Macrófagos peritoneais foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos fêmeas Swiss por lavagem com meio RPMI-1640 sem fenol red e suplementado com soro bovino a 10%. As células foram contadas e adicionadas 1×10^5 em placas de 16 poços (NUNCR) e mantidas pelo período de 18 horas a 37 °C na estufa com 5% de CO_2 . Ao final deste período, as células não aderentes foram removidas por duas lavagens com meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram infectadas com tripomastigotas durante 4 horas na proporção 5:1. Para obtenção do CE_{50} em amastigotas, as formas intracelulares do parasita permaneceram incubadas por 48 horas. Ao final, lâminas de vidro foram fixadas com MeOH durante 5 minutos e coradas com Giemsa por 7 minutos, para observação em microscópio óptico. A quantidade de parasitas foi definida por meio da contagem de 100 macrófagos/poço analisando o número de macrófagos infectados em comparação com o controle negativo (100% infectado) de macrófagos não tratados e como controle positivo, foi utilizado células

infectadas e tratadas com o fármaco benzonidazol (LUQUE et al., 2000, RAMIREZ-MACIAS et al., 2012).

4.4.5 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos

A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se células NCTC (clone 929; Fibroblasto), na concentração de 6×10^4 células/poço. As células foram incubadas com o composto isolado, e foi feita uma diluição seriada dos compostos com meio M-199 e 10% de soro fetal bovino em placas de 96 poços. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ por 48h. Após este período, foram adicionados 20 µL de resazurina a 10% em todos os poços, mantendo novamente em incubadora por mais 20 horas, com a leitura realizada da mesma forma descrita anteriormente. O IS foi determinado usando a seguinte relação: CC_{50} / CE_{50} (TEMPONE et al., 2005).

4.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras duplicadas de dois ensaios independentes. Os valores de CE_{50} foram calculados usando curvas sigmoide dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0, e os intervalos de confiança de 95% estão indicados entre parênteses na Tabela 4. O teste de Mann – Whitney foi utilizado para teste de significância (valor de P).

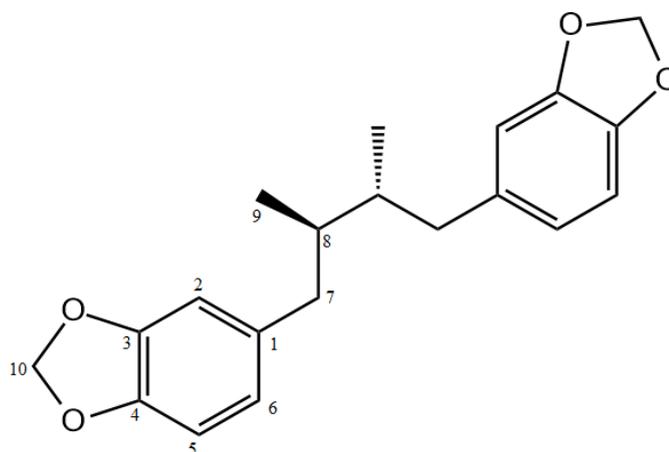
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural

As sucessivas etapas de separação cromatográfica permitiram a obtenção do composto *treo*-austrobailignana-5 das folhas de *Saururus cernuus*, cujo processo de identificação estrutural está descrito na sequência.

5.1.1 Identificação estrutural da *treo*-austrobailignana-5

Figura 10. Estrutura química da *treo*-austrobailignana-5



Fonte: autoria própria.

O espectro de RMN de ^1H do composto isolado (Anexo 02) apresentou um duplete em δ_{H} 0,79 ($J = 6,6$ Hz, H-9/H-9') e um multiplete em δ_{H} 1,72 referente aos grupos metínicos H-8/H-8'. Foi observado também a presença de hidrogênios benzílicos como duplo dupletos em δ_{H} 2,54 ($J = 13,5$ e 6,3 Hz) referente aos hidrogênios H7 e em δ_{H} 2,33 ($J = 13,5$ e 8,1 Hz) referente aos hidrogênios H7'. A presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído foi observada devido aos sinais em δ_{H} 6,54 (d, $J = 1,2$ Hz, H2), δ_{H} 6,69 (d, $J = 7,8$ Hz, H5) e em δ_{H} 6,54 (dd, $J = 7,8$ e 1,2 Hz, H6) além de um simpleto em δ_{H} 5,85 referente aos hidrogênios do grupo metilenodioxílico. Dados de deslocamento químico (δ_{H}) em comparação com a literatura foram elencados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Dados espectroscópios de RMN de ^1H do composto isolado (δ , 300 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (BRITO et al., 2018).

Posição	δ_{H} (mult, J/Hz)	δ_{H} literatura
1/1'	-	-
2/2'	6,55 (<i>d</i> , 1,5)	6,56 (<i>d</i> , 1,5)
3/3'	-	-
4/4'	-	-
5/5'	6,70 (<i>d</i> , 7,8)	6,68 (<i>d</i> , 7,8)
6/6'	6,55 (<i>dd</i> , 7,9 e 1,5)	6,50 (<i>dd</i> , 7,8 e 1,5)
7a/7'a	2,33 (<i>dd</i> , 13,4 e 6,0)	2,31 (<i>dd</i> , 13,5 e 6,6)
7b/7'b	2,54 (<i>dd</i> , 13,4 e 8,0)	2,55 (<i>dd</i> , 13,5 e 8,1)
8/8'	1,75-1,69 (<i>m</i>)	1,72 (<i>m</i>)
9/9'	0,80 (<i>d</i> , 6,54)	0,79 (<i>d</i> , 6,6)
10/10'	5,91 (<i>s</i>)	5,85 (<i>s</i>)

Fonte: autoria própria

O espectro de RMN de ^{13}C do composto isolado (Anexo 03) apresentou sinais em δ_{C} 13,8 (C9/C9'), 38,2 (C8/C8'), 41,1 (C7/C7'), 100,7 (C10/C10'), 107,9 (C5/C5'), 109,3 (C2/C2'), 121,7 (C6/C6'), 135,4 (C1/C1'), 145,5 (C4/C4'), 147,4 (C3/C3'). Dados de deslocamento químico (δ_{C}) em comparação com a literatura foram elencados na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6. Dados espectroscópios de RMN de ^{13}C do composto isolado (δ , 75 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (BRITO et al., 2018).

Posição	δ_{C}	δ_{C} literatura
1/1'	135,4	135,4
2/2'	109,3	109,7
3/3'	147,4	147,5
4/4'	145,5	145,5
5/5'	107,9	107,9
6/6'	121,7	121,8

7/7'	41,1	41,2
8/8'	38,2	38,2
9/9'	13,8	13,9
10/10'	100,7	100,7

Fonte: autoria própria

Por conseguinte, foi possível inferir que o composto isolado pertence a classe das neolignananas dibenzilbutânicas (HERATH e PRIYADARSHINI, 1996) e o composto isolado, por meio de comparação com os dados da literatura, foi identificado como sendo a *treo-austrobailignana-5*.

5.2 Ensaio de atividade biológica

O composto isolado foi avaliado quanto ao seu potencial antileishmanial frente às formas promastigota e amastigota da espécie *Leishmania (L.) infantum* e, novamente avaliado quanto ao seu potencial antitripanosomal frente às formas tripomastigota e amastigota da espécie *Trypanosoma cruzi*. Dados referentes ao ensaio biológico seguem sumarizados nas Tabelas 7 e 8 a seguir:

Tabela 7. Efeito antiparasitário do composto isolado *treo-austrobailignana-5* frente a *Leishmania infantum*.

Nome do composto	CE ₅₀ / μM	CE ₅₀ / μM	CC ₅₀ / μM (95% IC) NCTC	IS	IS
	(95% IC) <i>L. infantum</i> promastigota	(95% IC) <i>L. infantum</i> amastigota		promastigota	amastigota
<i>treo-austrobailignana-5</i>	87,3 ± 13,6	NA	> 200	>2,3	-
Miltefosina*	17,8 ± 1,4	16,7 ± 3,5	116,7 ± 5,3	6,5	7,0

Fonte: autoria própria

CE₅₀: Concentração efetiva a 50%; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50%; 95% IC: Intervalo de confiança a 95%; *Fármaco padrão.

Tabela 8. Efeito antiparasitário do composto isolado *treo*-austrobailignana-5 frente a *Trypanosoma cruzi*.

Nome do composto	CE ₅₀ / μM (95% IC) <i>T. cruzi</i> tripomastigota	CE ₅₀ / μM (95% IC) <i>T. cruzi</i> amastigota	CC ₅₀ / μM (95% IC) NCTC	IS tripomastigota	IS amastigota
<i>treo</i> -austrobailignana-5	NA	NA	> 200	-	-
Benzonidazol*	5,5 ± 2,2	16,2 ± 4,1	> 200	> 36,4	> 12,3

Fonte: autoria própria

CE₅₀: Concentração efetiva a 50%; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50%; 95% IC: Intervalo de confiança a 95%; *Fármaco padrão.

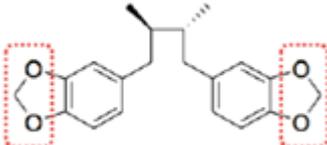
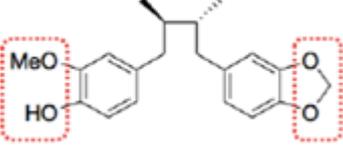
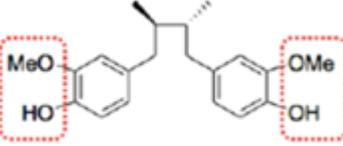
O composto *treo*-austrobailignana-5 mostrou-se moderadamente ativo frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, apresentando valor de concentração efetiva (CE₅₀) igual a 87,3 ± 13,6 μM, o que corresponde a um índice de seletividade superior a 2,3. Em relação às formas amastigotas do mesmo parasita, bem como frente às formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, o composto *treo*-austrobailignana-5 mostrou-se inativo.

Recentes estudos mostram que o mecanismo de ação de morte celular de *Trypanosoma cruzi* promovida por neolignanas isoladas de *Saururus cernuus* se dá via alteração no potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio, tais como ânions superóxidos (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxilas (OH[·]). O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio naturalmente produzidas pelo parasita, alterado pela presença de neolignanas, leva ao desenvolvimento de um estresse Oxidativo que culmina na morte do parasita (BRITO et al., 2019).

No intuito de compreender a inatividade do composto isolado *treo*-austrobailignana-5 frente a *Trypanosoma cruzi*, Brito (2018) mostrou que a presença do grupo metilenodioxílico em ambos os anéis aromáticos é determinante para a inatividade da molécula. Por outro lado, a presença de grupos hidroxila e metoxila em um ou em ambos os anéis contribui para o aumento da atividade biológica, ainda que possa haver uma elevação de citotoxicidade frente a células de mamíferos.

A Tabela 9 a seguir compara o efeito antiparasitário em função dos substituintes nos anéis aromáticos.

Tabela 9. Influência da substituição dos anéis aromáticos de neolignanas isoladas de *Saururus cernuus*.

Nome do composto	Estrutura química	Efeito
<i>treo</i> -austrobailignana-5		Grupo metilendioxiílico em ambos os anéis torna a molécula inativa. Não apresenta citotoxicidade.
<i>treo</i> -austrobailignana		Combinação dos grupos hidroxila e metoxila em um anel e metilendioxiílico no outro aumenta a atividade frente à forma tripomastigota (<i>T. cruzi</i>) e inativa frente a forma amastigota (<i>T. cruzi</i>). Citotoxicidade aumenta.
ácido <i>treo</i> -dihidroguaiarético		Grupo hidroxila e metoxila em ambos os anéis aumenta a atividade em ambas as formas do parasita (<i>T. cruzi</i>). Não apresenta citotoxicidade.

Fonte: Brito (2018), adaptado.

Vale ressaltar que o composto *treo*-austrobailignana-5, ainda que moderadamente ativo frente à forma promastigota de *L. (L.) infantum*, apresentou menor concentração citotóxica (CC_{50}) em relação a fármaco padrão, com valor correspondente superior a 200 μM contra $116,7 \pm 5,3$ da Miltefosina.

Tal dado, bem como o fato do composto isolado ser majoritário na fase hexânica do extrato metanólico de *Saururus cernuus*, sugere que novas pesquisas de modificação estrutural no composto *treo*-austrobailignana-5 são necessárias de modo a aumentar seu índice de seletividade frente aos parasitas *L. (L.) infantum* e *T. cruzi*. Reações de hidratação e substituição nucleofílica podem ser estudadas no C-7/C-7' de modo a produzir derivados semissintéticos, novamente submetendo-os aos ensaios biológicos descritos neste trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu o isolamento da neolignana identificada como *treo-austrobailignana-5*, um composto majoritário presente na fase hexânica do extrato metanólico das folhas de *Saururus cernuus*. A caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C comparada com dados da literatura confirmaram a presença da substância. O composto isolado foi avaliado quanto ao seu potencial antileishmanial e antitripanosomal, no qual foi verificada reduzida atividade biológica frente a forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum*, e uma menor toxicidade em relação ao fármaco padrão miltefosina. Também foi verificada inatividade frente a forma amastigota do parasita anterior, bem como às formas amastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Em vista disso, conclui-se que este trabalho abre um espaço para futuros estudos de derivados semissintéticos a partir da *treo-austrobailignana-5*, que poderão ser submetido aos mesmos ensaios biológicos neste trabalho realizados. De tal maneira, que se possa ampliar as investigações no desenvolvimento de novos protótipos moleculares que por fim resultem em terapias alternativas frente a essas doenças tropicais negligenciadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, A. et al. **Neglected tropical diseases – challenges and opportunities in India.** Indian Journal of Medical Specialties. 8. 102-108. 10.1016/j.injms.2017.07.006., 2017

ALEXANDRE, et al. **Tratamento etiológico da Doença de Chagas: um antigo problema de Saúde Pública.** *Revista Uningá Review* v. 20, no. 2, p. 91-96, 2018

ALEXANDRE, J. P. D. O. **Tratamento etiológico da doença de chagas: um antigo problema de saúde pública.** *Revista Uningá Review*, v. 20, n. 2, 2018.

ALMEIDA, T. L. et al. **Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*.** *Quimica Nova*, v. 37, n. 7, p. 1151-1157, 2014.

ATWOOD, J. 3., et al. **The *Trypanosoma cruzi* proteome.** *Science*, v. 309(5733), p. 473-476., 2005.

BARCELLOS, A. F. **Diterpenos ent-caurânicos das partes aéreas de *Baccharis retusa* (Asteraceae) e derivados semissintéticos - caracterização molecular, avaliação de atividade e do mecanismo de ação frente à *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação (Dissertação em Ciência e Tecnologia, Química) – UFABC, Santo André, p. 109, 2018

BARRETO, M. L., et al. **Saúde no Brasil 3 - Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa.** *Lancet* (2015): 47-60.

BASANO, S. & CAMARGO, L. **Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328-337, 2004

BERLINCK, R. G. S. **A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI.** *Química Nova*, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017

BERN, C. et al. **Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review.** *Jama*, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.

BOLZANI, V. S. **Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil.** *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 04-05, Mar. 2016

BRAHMACHARI, G. **Therapeutics from natural products against neglected tropical diseases: an overview.** *Natural Product Drug Discovery*, p. 1-6, 2019

BRASIL **Leishmaniose visceral 2017** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2017

BRITO, J. R. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antiparasitário e citotóxico de metabólitos especiais isolados das folhas de *Saururus cernuus* L. (Saururaceae).** Dissertação (Mestrado em BIOLOGIA QUÍMICA) - Universidade Federal de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. 2018.

BRITO, J. et al. **Isolation of cytotoxic neolignans from *Saururus cernuus* L.(Saururaceae) using ionic liquid in the microwave assisted extraction (MAE).** *Química Nova*, 41(7), 778-781., 2018

BRITO, J. et al. **Dibenzylbutane neolignans from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) displayed anti-trypansomoma cruzi activity via alterations in the mitochondrial membrane potential** *Fitoterapia*, 137, (204251), 2019

CONSERVA, G. A. A., et al. **Butenolides from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) displayed anti-Trypanosoma cruzi activity via deregulation of mitochondria.** *Phytomedicine*, 54, 302-307, 2018.

COOPER, R. & NICOLA, G. **Natural Products Chemistry: Sources, Separations and Structures** *CRC Press*, ISBN 9781466567610, 2014

CORRÊA, A. et al. **Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91., n. 12, p. 2247-2254, 2011.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, M. et al. **Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil.** *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

DE SOUSA, F. S. **Metabólitos naturais e semissintéticos dos galhos de *Nectandra leucantha* Ness Mart. (Lauraceae) caracterização molecular, avaliação do potencial e mecanismo antitumoral contra melanoma.** Tese (Doutorado em BIOLOGIA QUÍMICA) - Universidade Federal de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2018.

DIAS, L. C. e DESSOY, M. A. **Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de oportunidades.** *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1552-1556, 2013

DIAS, J. C. P. et al. **II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 7-86, 2016.

FERREIRA, R. T. B. et al. **Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária.** *Vigilância Sanitária em Debate*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.

FORSYTH, C. J. et al. **Safety profile of nifurtimox for treatment of Chagas disease in the United States.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 8, p. 1056-1062, 2016.

GEHRKE, S. et al. **Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators** *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 21, n. 3, p. 805-813, 2013

GOTIJO, C. & MELO, M. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas** *Revista Brasileira de Epidemiologia* v. 7, p. 338-349, p. 2004

GRECCO, S. S. **Prospecção químio-farmacológica de *Baccharis Retusa* (Asteraceae) – análise fitoquímica e seleção de compostos com atividade antileishmania e antitripanossoma.** Dissertação (Dissertação em Ciências) – UNIFESP, Diadema, p. 97, 2012

GRECCO, S. S. et al. **In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae).** *Experimental Parasitology* v. 130, p. 141-145, 2011

GRÍMSSON, F. et al. **Tiny pollen grains: first evidence of Saururaceae from the Late Cretaceous of western North America** *PeerJ*, 5, p.e3434, 2017

HAVILAND, W. et al. (2013). **Cultural Anthropology: The Human Challenge.** Cengage Learning. p. 250. ISBN 978-1285675305

HERATH, H. B., & PRIYADARSHANI, A. A. **Two lignans and an aryl alkanone from *Myristica dactyloides*.** *Phytochemistry*, 42(5), 1439-1442., 1996

JOLY, C. A et al. **Evolution of the brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation.** *Environment and biodiversity* 51(5/6): 331-348., 1999

KESPER, N. et al. **Immunoblot Analysis of Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens as a Tool for the characterization of Trypanosoma cruzi Strains and Isolates** *Journal of Parasitology*, v. 86., n.4., p. 862-868, 2000

LUQUE, F. et al. **In vitro evaluation of newly synthesized [1,2,4]triazol[1,5a]pyrimidine derivatives against Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani and Phytomonas staheli.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 126 39-44, 2000

LINDOSO, J. A. L. et al. **Neglected tropical diseases in Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* v.51 (5), p. 247-253, Sept-Out- 2009

MENG, X. et al **Anti-inflammatory effects of *Saururus chinensis* aerial parts in murine macrophages via induction of heme oxygenase-1** *Experimental Biology and Medicine*, 241.4 p. 396-408, 2016

MERNAK-BITTENCOURT, M. I. **Prophylactic and therapeutic treatment with the flavone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* v. 312 p. 217-230, 2017

MIKUS, J. e STEVERDING, D. **A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue®.** *Parasitology international*, v. 48, n. 3, p. 265-269, 2000.

NISHIOKA, S. A. **Benznidazol na quimioprofilaxia primária da reativação de doença de Chagas em chagásicos crônicos em uso de corticosteróides em doses imunodepressoras: há evidência suficiente para a recomendação de uso?.** *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 33, n. 1, p. 83-85, 2000.

OMS. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas** n. 7, p. 7, 2019

PEREIRA, et al. **Chagas' disease as a foodborne illness**. Journal of food protection v. 72, no. 2, p. 441-446, 2009

PEREIRA, P. C. M. e NAVARRO, E. C. **Challenges and perspectives of Chagas disease: a review**. Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PINHEIRO, E. et al. **Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017.

PONTES, V. M. O. de et al. **Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 43, n. 2, p. 182-7, 2010.

RAMÍREZ-MACIAS, I. et al ***In vitro* anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*** Journal of inorganic biochemistry, v. 121. p. 1-9, 2012

RAMOS CAMPOS, F. et al. ***Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities**. Chemistry & biodiversity, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2016.

REIMÃO, J. et al. ***In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real time PCR** Experimental parasitology v. 128, n.2, p.111-115, 2010

SOARES, L.M.B. **Eliminação da transmissão e morbidade da infecção chagásica crônica em pacientes autóctones da microrregião do rio negro, Estado do Amazonas (1997 – 2008)**. Dissertação. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2009:140.

STAUBER, L. A., et al. **An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster**. The Journal of Protozoology, 5(4), 269-273, 1958

TADA, H. et al. **An improved colorimetric assay for interleukin 2**. J. Immunol. Methods 1986, 93, 157 – 165.

TEPONNO, R. et al. **Recent advances in reseach on lignanas and neolignans**. Natural products reports, v. 33, n. 9, p. 1044-1092, 2016

TEMPONE, A. G. et al. **Antitptotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families** Phytomedicine 12.5 382-390, 2005

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited**. International journal for parasitology, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.

UENO, A. K. **Constituintes químicos das partes aéreas de *Baccharis Retusa* (Asteraceae) – identificação e avaliação de atividade biológica**. Dissertação (Dissertação em Ciência da Tecnologia e Sustentabilidade) – UNIFESP, Diadema, p. 122, 2017

UENO, A. K. et al. **Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae).** *Fitoterapia* v. 125, p. 55-58, 2017

UENO, A. K. et al. **Sesquiterpenes, diterpenes, alkenyl p-coumarates, and flavonoid from the aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae).** *Biochemical Systematics and Ecology* v. 78, p. 39-42, 2018

VIEGAS JR, C. et al. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2017

WRIGHT, Ronald (2004). **A Short History of Progress.** House of Anansi. pp. 115, 117, and 212. ISBN 9780887847066.

WERNECK, G. L. **Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?** (2016): eED010616.

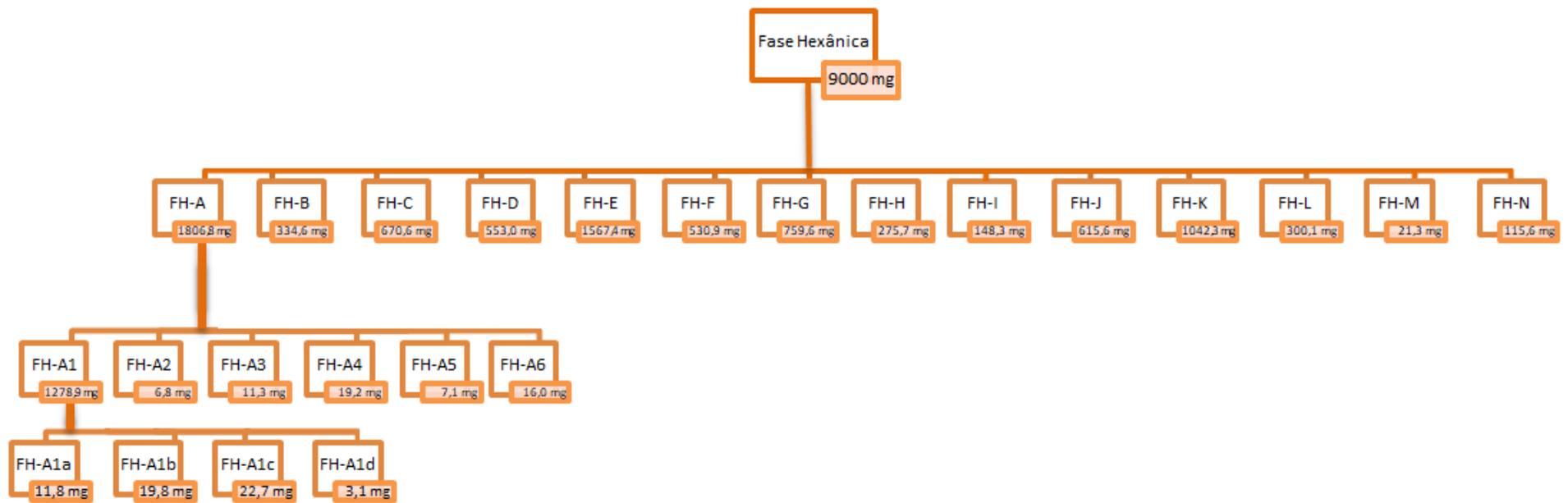
YARDLEY, V. et al. **Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine** *Antimicrobial agents and chemotherapy* v. 54, n. 12, p. 5356-5358, 2010.

ZÁLEŠÁK, F. et al. **Lignans and Neolignans: plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances.** *Pharmacological research*, p. 104284, 2019.

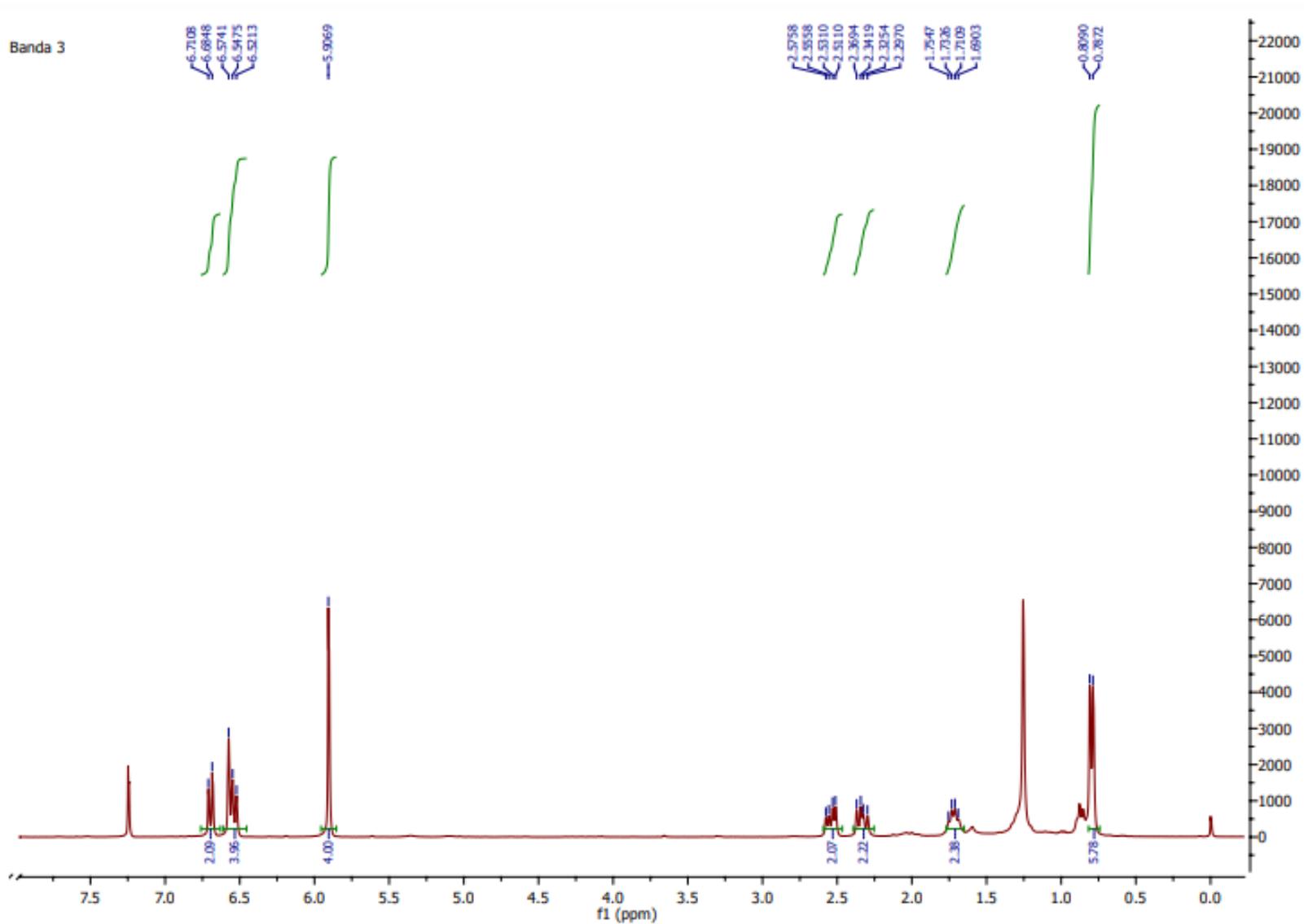
ZHENG, Defang, et al. **Bioaccumulation of antimony and arsenic in vegetables and health risk assessment in the superlarge antimony-mining area** *Journal of analytical methods in chemistry* 2015 (2015) China.

ANEXOS

Anexo 01. Fluxograma do fracionamento da fase hexânica



Anexo 02. Espectro de RMN de ^1H do composto *treo*-austrobailignana-5 (δ , CDCl_3 , 300 MHz)



Anexo 03. Espectro de RMN de ^1H do composto *treo*-austrobailignana-5 (δ , CDCl_3 , 75 MHz)

