

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

CALVIN QUESSADA CABELLO

**BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTI-
Trypanosoma cruzi DOS GALHOS DE *Senna macranthera***

Santo André
Novembro - 2022

CALVIN QUESSADA CABELLO

**BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTI-
Trypanosoma cruzi DOS GALHOS DE *Senna macranthera***

Monografia de Trabalho de Conclusão de
Curso, apresentado ao Bacharelado em
Química da UFABC para obtenção do
título de Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés
de Oliveira

Calvin Quessada Cabello

Hueder Paulo M. de Oliveira

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).

Cabello, Calvin Quessada
BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTI-Trypanosoma cruzi DOS
GALHOS DE *Senna macranthera* / Calvin Quessada Cabello. — 2022.

37 fls. : il.

Orientador: Hueder Paulo Moisés de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado
em Química, Santo André, 2022.

1. Fitoquímica. 2. Doença de Chagas. 3. *Senna macranthera*. I. de Oliveira,
Hueder Paulo Moisés. II. Bacharelado em Química, 2022. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Monografia apresentada pelo aluno Calvin Quessada Cabello, em 21 de novembro de 2022.

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Examinador UFABC

Prof. Dr. Vani Xavier de Oliveira Junior
Examinador UFABC

Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meu pais e meu irmão por todo o apoio que deram por toda a jornada que passei pela UFABC. Aos meus amigos que me ajudaram a suportar os desafios que enfrentei na universidade e que fazem com que tudo fique mais leve e mais fácil. Agradeço em especial, a minha colega e mentora no laboratório Cris, por toda ajuda e ensinamentos de todas as atividades do laboratório, mas também a todos os meus colegas do laboratório 407-3, que me acolheram, me ajudaram e me fizeram rir muito durante o ano. Agradeço ao Prof. Dr. André Tempone e pelo trabalho de colaboração dos ensaios biológicos das substâncias estudadas. Agradeço ao Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago pela disposição em organizar e compor a banca desse trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em Química, por me receber em seu grupo de pesquisa para a colaboração e desenvolvimento desse projeto e pelo auxílio prestado. Agradeço ao Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira ao pela orientação concedida, por me acolher em seu grupo de pesquisa e toda a paciência e as lições nesses 3 anos que pude tê-lo como orientador desde a minha primeira Iniciação Científica. 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 projetos de pesquisa. Agradeço à Universidade Federal do ABC, que apesar de todos os perrengues proporcionou os melhores anos que poderia sonhar realizando a faculdade, e por último, mas não menos importante ao corpo docente do Bacharelado em Química, pelos ensinamentos e parceria que tornaram o aluno e pesquisador que sou hoje.

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical, parasitária e considerada negligenciada pela OMS. Tida como um grave problema de Saúde Pública, é relacionada ao perfil socioeconômico dos países em desenvolvimentos, presentes nas regiões tropicais do planeta. Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas foram desenvolvidos na década de 60 do século XX, possuindo uma toxicidade considerável e apresentando diversos efeitos colaterais, com uma baixa eficácia de tratamento. Nesse cenário, a química de produtos naturais se faz presente na busca de potenciais compostos para o desenvolvimento de novos fármacos. O gênero *Senna* (Leguminosae) contém aproximadamente 260 espécies, encontradas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, e distribuídas amplamente pelo Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Essas espécies possuem uma variedade de propriedades farmacológicas incluindo antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória. Dessa forma, este trabalho buscou o isolamento e caracterização estrutural de metabólitos do extrato hexânico dos galhos de *Senna macranthera*, assim como a realização de bioensaios para determinação de ação antiparasitária frente à *Trypanosoma cruzi*. Por meio de diferentes métodos cromatográficos, foram obtidos dois esteroides - β -sitosterol e sitostenona que foram caracterizados por análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C seguido da comparação com dados descritos na literatura. Os dois esteróides isolados foram então avaliados quanto a sua atividade frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*, e à citotoxicidade frente a células de mamíferos. Os ensaios biológicos indicaram que a sitostenona se mostrou ativa frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* apresentando CE_{50} de $19,3 \pm 4,6 \mu\text{M}$, além de reduzida toxicidade frente às células do tipo NCTC ($\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{M}$), ao passo que o β -sitosterol se mostrou inativo ($\text{CE}_{50} > 150 \mu\text{M}$). Dessa maneira, os resultados obtidos permitem inferir que a sitostenona pode ser utilizada como protótipo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Fitoquímica, esteroides, doença de Chagas

ABSTRACT

Chagas disease is a tropical, parasitic disease considered neglected by the WHO. Considered a serious Public Health problem, it is related to the socioeconomic profile of developing countries, present in the tropical regions of the planet. The drugs available for the treatment of Chagas disease were developed in the 60's, having considerable toxicity and presenting several side effects, with a low treatment efficacy. In this scenario, the chemistry of natural products is present in the search for potential compounds for the development of new drugs. The genus *Senna* (Leguminosae) contains approximately 260 species, found worldwide in tropical and subtropical regions, and widely distributed throughout the Northeast, Southeast and South of Brazil. These species possess a variety of pharmacological properties including antioxidant, anticancer and anti-inflammatory. Thus, this work sought the isolation and structural characterization of metabolites from the hexane extract of *Senna macranthera* barks, as well as the performance of bioassays to determine the antiparasitic action against *Trypanosoma cruzi*. By means of different chromatographic methods, two steroids were obtained - β -sitosterol and sitostenone that were characterized by analysis of ^1H and ^{13}C NMR followed by comparison with data described in the literature. The two isolated steroids were then evaluated for their activity against trypomastigote form of *T. cruzi*, and for their cytotoxicity against mammalian cells. Biological assays indicated that sitostenone was active against trypomastigote form of *T. cruzi*, presenting EC_{50} of $19.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$, in addition to reduced toxicity against NCTC cells ($\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{M}$), while β -sitosterol was shown to be inactive ($\text{EC}_{50} > 150 \mu\text{M}$). Thus, the results obtained allow us to infer that sitostenone can be used as a molecular prototype for the development of new drugs for the treatment of Chagas disease.

Key-words: Phytochemistry, steroids, Chagas disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de alguns dos principais compostos isolados e derivados de produtos naturais	13
Figura 2 - Distribuição global de casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018	15
Figura 3 - Distribuição de cadastros autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, Brasil, dez/2015	16
Figura 4 – Ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas diferentes formas	17
Figura 5 - Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas	18
Figura 6 - Fotografias de <i>Senna macranthera</i> . Uso na arborização urbana, ocorrência natural, inflorescência, fruto, tronco e sementes	20
Figura 7 – Fluxograma do processo de extração e isolamento das substâncias trabalhadas	27
Figura 8 – Estrutura química dos β -sitosterol e sitostenona	30
Figura 9 – Estrutura química do clerosterol	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos formados após o fracionamento do extrato hexânico de <i>S. macranthera</i> ..	25
Tabela 2 - Grupos formados após o fracionamento das frações SMGH 7 e 8	26
Tabela 3 - Dados espectroscópios de RMN de ^1H e ^{13}C do β -sitosterol (δ , 500 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (ODODO et al., 2016)	31
Tabela 4 - Dados espectroscópios de RMN de ^1H e ^{13}C da Sitostenona (δ , 500 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (LEE et al., 2010)	33
Tabela 5 - Efeito antiparasitário dos compostos isolados de <i>Senna macranthera</i> frente a forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C - Antes de Cristo
AAS - Ácido acetilsalicílico
AS - Ácido salicílico
ATCC - American Type Culture Collection
CC – Cromatografia em coluna
CCD – Cromatografia em camada delgada
CC₅₀ – Concentração Citotóxica a 50%
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CE₅₀ – Concentração Efetiva a 50%
CEM - Central Experimental Multiusuário
DC – Doença de Chagas
DMSO – Dimetilsufóxido
d – Duplete
Hz – Hertz
IS – Índice de Seletividade
m - Multiplete
mult. - Multiplicidade
mg – Miligramas
MHz – Megahertz
MS - Ministério da Saúde do Brasil
OMS - Organização Mundial da Saúde
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPMI – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
s – Simpleto
SIAB - Sistema de Informação de Atenção Básica
SFB – Soro fetal bovino
SUS – Sistema Único de Saúde
t - Tripleto
TMS - Tetrametilsilano
UV – Ultravioleta
 δ – Deslocamento Químico (ppm)
 λ – Comprimento de onda (nm)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Química dos Produtos Naturais	12
1.2 Doença de Chagas	14
1.3 Gênero <i>Senna</i>	18
1.3.1 <i>Senna macranthera</i>	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Equipamentos	22
3.2 Materiais	22
3.2.1 Solventes	22
3.2.2 Materiais Cromatográficos	22
3.2.3 Material vegetal	23
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
4.1 Extração	24
4.2 Fracionamento cromatográfico	24
4.3 Ensaio biológico in vitro	27
4.3.1 Parasitas	27
4.3.2 Células de mamíferos	28
4.3.3 Determinação do potencial frente a <i>Trypanossoma cruzi</i> – tripromastigotas	28
4.3.4 Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos	28
4.3.5 Análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Identificação estrutural	30
5.2 Ensaio biológico	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Química de Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. (VIEGAS apud RIBEIRO, 2021).

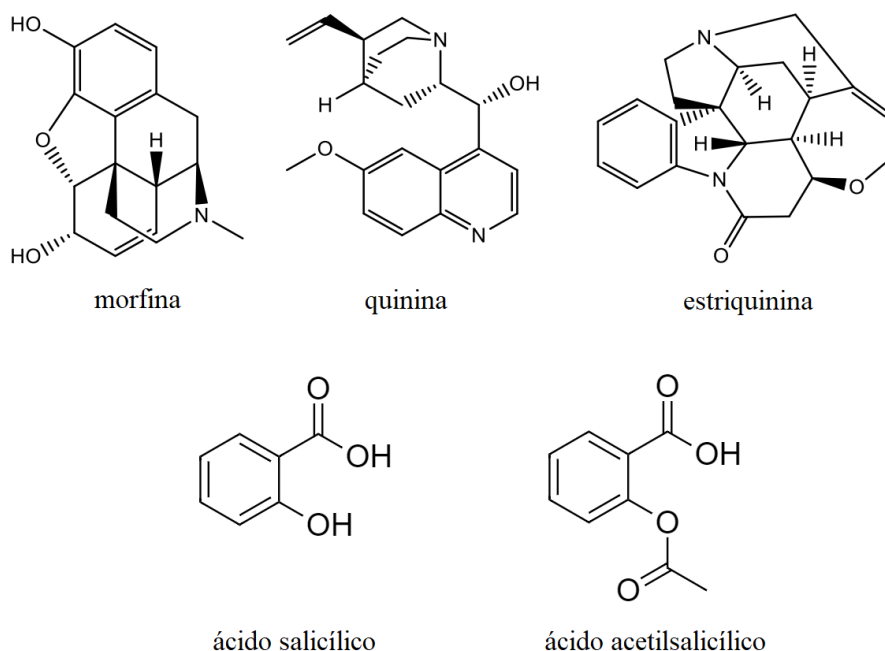
As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam ao papiro de Ebers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers e pertence à época da XVIII dinastia egípcia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (VILELA apud ARGENTA, 2011). Durante o período da civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 a.C), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. É seu o registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina. Documentos sumerianos de 5000 a.C referem-se à papoula (*P. somniferum*) e tábulas assírias descrevem suas propriedades. (VALLE apud ARGENTA, 2011).

Evidências arqueológicas mostram que o uso de drogas vegetais era amplo em culturas antigas. Nozes de bétel, uma planta aromática que contém substâncias psicoativas, eram mascaradas há 13 mil anos no Timor; artefatos descobertos no Equador estendem o uso das folhas de coca 5000 anos atrás. A civilização árabe, no século VII, descreveu o emprego dos purgativos e cardiotônicos de origem vegetal. As culturas americanas, especialmente a Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca consignaram à civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas vegetais de valor terapêutico, até hoje indispensável a medicina moderna. (MARINI-BETTÒLO apud; ARGENTA, 2011).

Ao longo dos séculos e várias civilizações muitas utilizações de plantas medicinais e seus compostos foram explorados, desde os árabes, aos europeus na idade média quanto as tribos indígenas por todo o mundo. Mas é com o avanço da ciência que se começa a descobrir os componentes por trás dessas atividades farmacológicas.

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a acontecer no século XVIII com a realização pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. É desta época o isolamento de morfina (1806), quinina e estriquinina (1820) (figura 1) (PINTO, 2002). Muitos outros compostos foram encontrados ao longo do tempo e são importantes até hoje, como exemplo temos a salicina, cuja modificação estrutural resultou no ácido salicílico (AS), utilizado no tratamento de artrite reumatoide. Posteriormente, a partir do AS, foi obtido o ácido acetilsalicílico (AAS), um dos analgésicos mais utilizados no mundo, a Aspirina® (figura 1) (NEWMAN, D.J; CRAGG 2020).

Figura 1 – Estrutura de alguns dos principais compostos isolados e derivados de produtos naturais.



Fonte: Autoria própria, realizado pelo Chem Draw.

Apesar de a química de produtos naturais apresentar um desenvolvimento relativamente lento até os anos 1960, foi com o advento das ferramentas de análise espectroscópica e com o desenvolvimento recente de técnicas hifenadas que foi possível obter um amplo conhecimento sobre o metabolismo secundário dos organismos vivos. O surgimento das ferramentas de biologia molecular entre o fim dos anos 1980 e início dos anos 1990 permitiu desvendar o universo de regulação genética e do maquinário enzimático envolvidos na biossíntese e expressão do metabolismo secundário. A partir da combinação de todas essas ferramentas que

hoje é possível a investigação do sistema bioquímico de qualquer sistema biológico, seja microbiano, vegetal ou animal (BERLINCK et al., 2017).

Com essa crescente no ferramental para o descobrimento de cada vez mais produtos naturais a sua utilização pela indústria farmacêutica aumentou pelas décadas. Um estudo realizado por Newman e Cragg (2020) enfatiza a importância de pesquisas com produtos naturais, pois entre o início de 1981 e final de 2019, foram registrados um total de 1881 fármacos totais aprovadas, sendo que apenas 27,8 % eram de origem totalmente sintética e 64,4 % desses medicamentos eram produtos naturais ou foram baseados neles, ou imitavam produtos naturais.

Dessa forma, para combater às doenças tropicais negligenciadas, em especial para esse trabalho a doença de Chagas, a Química de Produtos Naturais é de vital importância e surge como aliada na procura de substâncias com potencial antiparasitário e com baixa citotoxicidade para a criação de novos fármacos.

1.2 Doença de Chagas

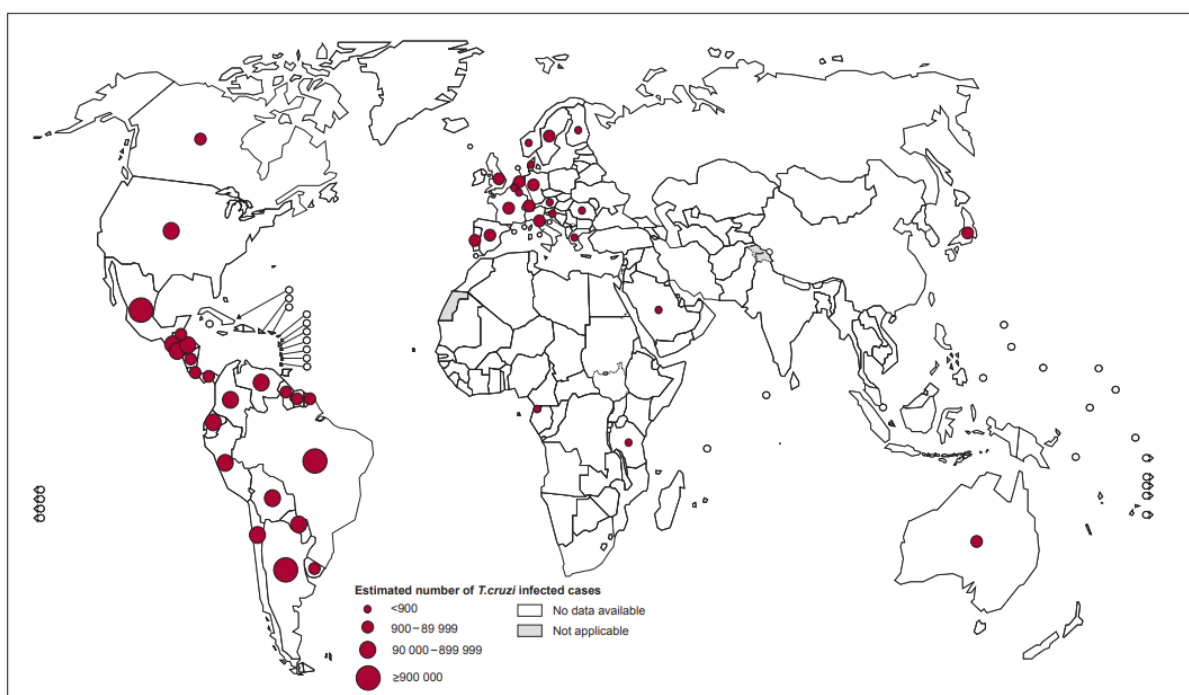
A doença de Chagas (DC) existe há milhões de anos como uma enzootia em animais silvestres e passou a ser transmitida ao homem acidentalmente quando este invadiu os ecossistemas silvestres. Existem indícios de que a infecção humana pelo protozoário *Trypanossoma cruzi* ocorre há pelo menos cinco mil anos A.C, época em que populações nômades do deserto de Atacama - Chile estabeleceram uma rota entre o mar e as montanhas. Foram identificadas em múmias da época, recuperadas desta região, resquícios moleculares do *T. cruzi* (Ministério da Saúde, 2020).

Entretanto, o primeiro relato dessa doença foi feito em 1909, pelo brasileiro e sanitarista Carlos Chagas, que detectou o parasito em uma criança de dois anos, na cidade de Lassance - MG. Este fato foi considerado um marco na história da medicina devido ao descobrimento simultâneo do vetor (inseto conhecido popularmente como barbeiro – gênero *Triatoma*); do agente etiológico da doença (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e sua patologia (KROPF, 2010).

A DC insere-se no grupo de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde do Brasil (MS), apresentando elevada prevalência e expressiva carga de morbimortalidade, perpetuando um ciclo crítico de pobreza (MARTINS-MELO, 2016).

Endêmica em 21 países das Américas, a doença acomete aproximadamente 6 milhões de pessoas, com incidência anual de 30 mil casos novos na região, ocasionando, em média, 14.000 mortes/ano e 8.000 recém-nascidos infectados durante a gestação. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair a doença (WHO, 2022). O panorama mundial da doença pode ser visto pela figura 2, com dados das estimativas oficiais realizadas pela ONU.

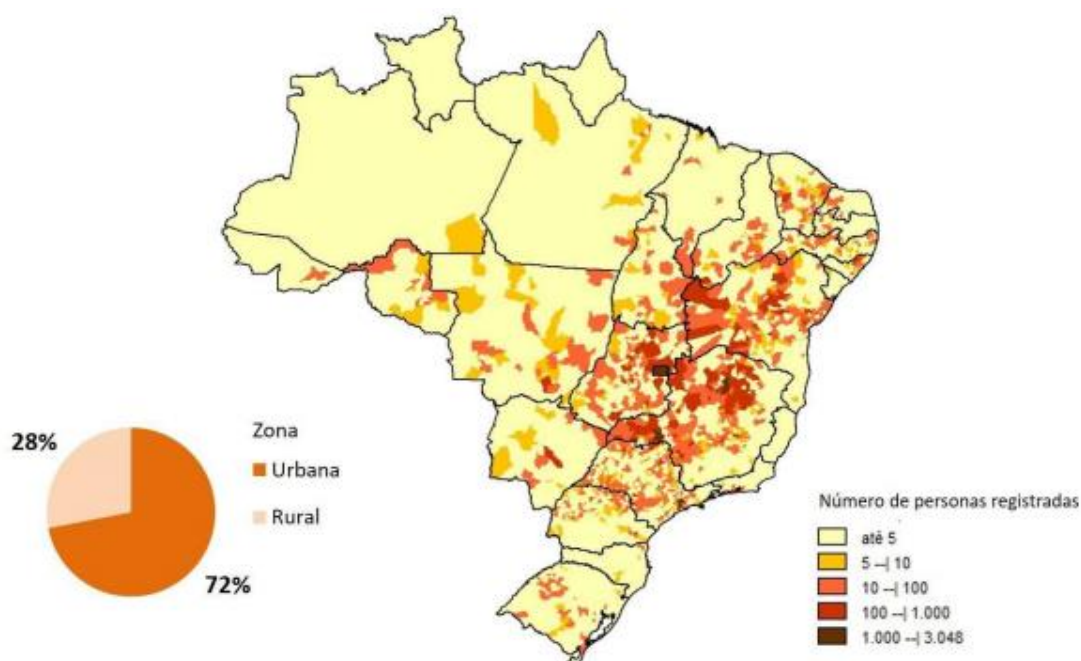
Figura 2 - Distribuição global de casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais, 2018.



Fonte: (WHO, 2018).

Estima-se que atualmente no Brasil de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi*. A doença de Chagas, com sua elevada carga de mortalidade, representa uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no país. Nos últimos 10 anos, foram registrados em média 4.000 óbitos a cada ano (DIAS, et al., 2016; MARTINS-MELO, 2016). A distribuição de casos da doença de Chagas pelo país pode ser vista na figura 3, dados do último levantamento completo apresentado nos relatórios anuais da doença de Chagas realizados pelo Ministério da Saúde.

Figura 3 - Distribuição de cadastros autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, Brasil, dez/2015.



Fonte: Sistema de Informação de Atenção Básica (SIAB)/MS.

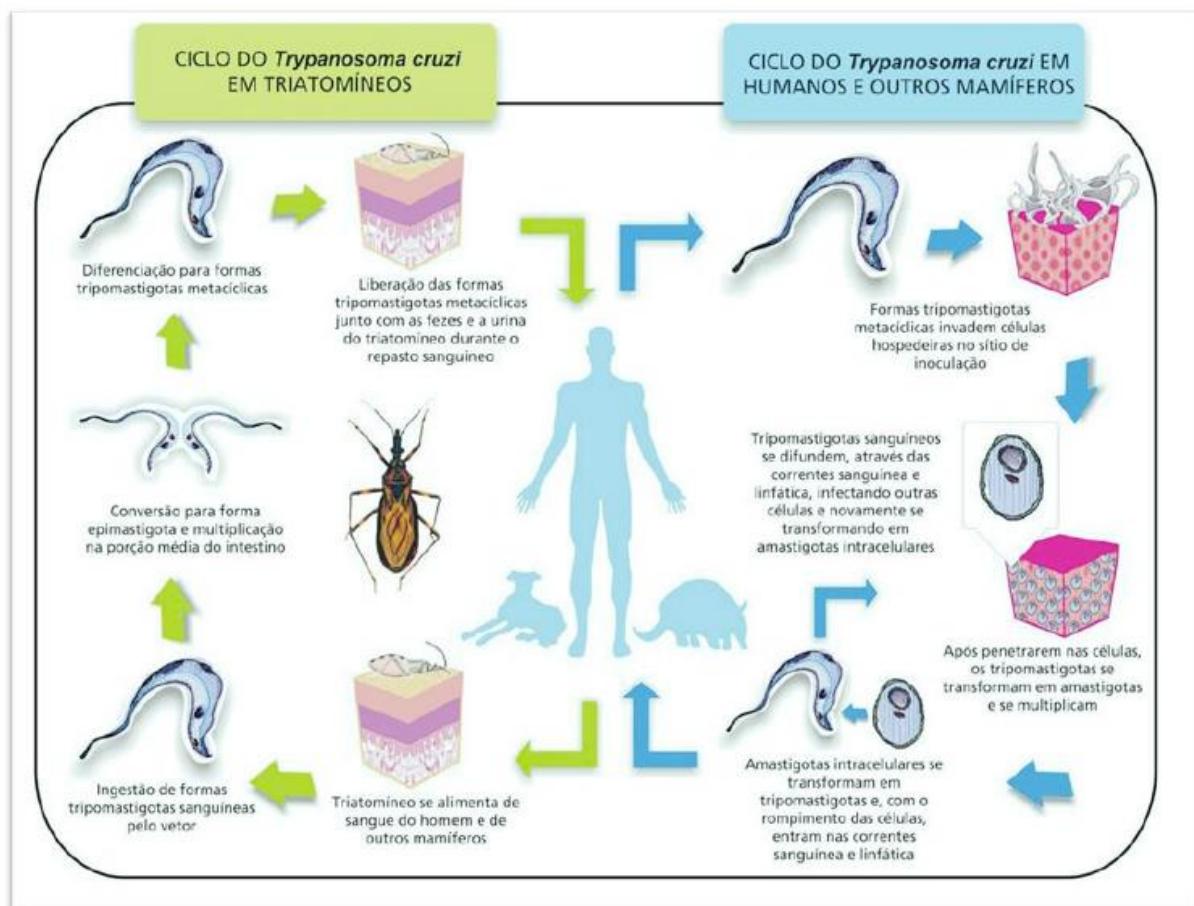
A transmissão da doença ocorre via vetorial, neste caso, pelo contato com fezes e/ou urina do inseto vetor contaminado, a doença também pode ser transmitida por transfusão de sangue, transplante de órgão, pela ingestão de alimentos contaminados, durante a gravidez ou parto, da mãe contaminada para o filho. (CORREIA et al., 2021).

Os vetores são insetos que se alimentam de sangue da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros, chupão ou bicudo. Existem mais de 140 espécies de triatomíneos responsáveis pela transmissão natural da infecção, sendo encontradas 68 espécies só no Brasil (JURBERG et al., 2014; BRASIL, 2019).

O *T. cruzi* é um protozoário que apresenta três formas evolutivas: epimastigota (forma presente no vetor ou em cultura pura), tripomastigota (forma infectante) e amastigota (forma que se multiplica dentro das células dos hospedeiros). Sua transmissão ocorre quando o vetor infectado se alimenta e deposita suas fezes e/ou urina contendo a forma infectante. A picada causa uma irritação, provocando coceira, permitindo assim que o parasita atravessasse a epiderme (DIAS; COURA, 1997). Após sua inoculação no organismo, a forma tripomastigota do *T. cruzi* penetra no interior das células, evoluindo para a forma amastigota que, posteriormente, se replica, produzindo de 50 a 500 amastigotas. Após a replicação, os amastigotas retornam para

a forma tripomastigota. A célula se rompe liberando os tripomastigotas para infectar células de outros órgãos e tecidos, repetindo assim o ciclo (DIAS; COURA, 1997).

Figura 4 – Ciclo do *Trypanosoma cruzi* e suas diferentes formas.

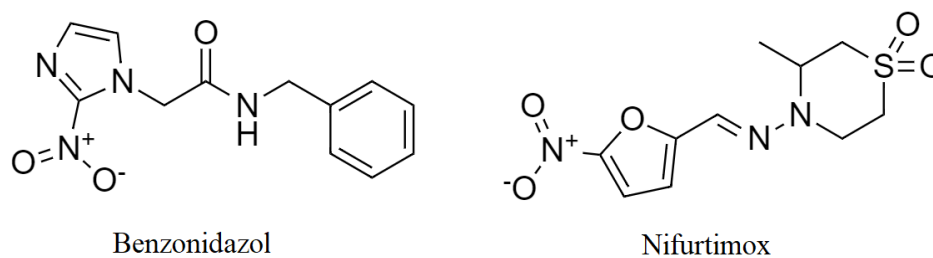


Fonte: CRID (2019).

Os fármacos disponíveis para o tratamento (cura parasitológica na fase aguda) apresentam toxicidade dose-dependente, sendo elas benzonidazol e nifurtimox (Figura 3). No Brasil, apenas o primeiro tem autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para ser comercializado porque o nifurtimox é altamente tóxico. Enquanto o benzonidazol é distribuído gratuitamente pelo SUS.

Os efeitos colaterais mais comuns do fármaco nifurtimox incluem perda de peso, náuseas, vômitos e cólicas intestinais, enquanto que o benzonidazol produz dermatite com erupção cutânea (entre o 7º e 10º dia de tratamento), edema periorbital ou generalizado, febre, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite, entre outros (CASTRO; DEMECCA; BARTEL, 2006).

Figura 5 - Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.



Fonte: Autoria própria, realizado pelo Chem Draw.

1.3 Gênero *Senna*

O gênero *Senna* é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (AGARKAR e JADGE, 1999). Algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais. Recentemente, revisões na classificação botânica dos gêneros *Cassia* e *Senna* levaram à transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Espécies de *Cassia*, juntamente com algumas que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica adotado, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VIEGAS et al, 2006).

Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, o gênero *Senna* é muito frequente, sendo que na região sudeste algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais e na arborização. Algumas espécies são bastante usadas na medicina tradicional como purgativos; outras são usadas na recuperação de áreas degradadas, as espécies propiciam relações ecológicas interespecíficas importantes (LORENZI, 1992).

Espécies do gênero *Senna* revelaram uma grande diversidade de substâncias bioativas, com padrões moleculares variados. A literatura descreve o isolamento de cerca de 350 metabólitos secundários em espécies desse gênero que se encontram amplamente distribuídas em várias partes do mundo. Estes estudos evidenciaram a ocorrência de substâncias de diversas classes, sendo as antraquinonas, flavonoides e outros compostos fenólicos os constituintes mais frequentes na maioria das espécies (VIEGAS et al, 2006).

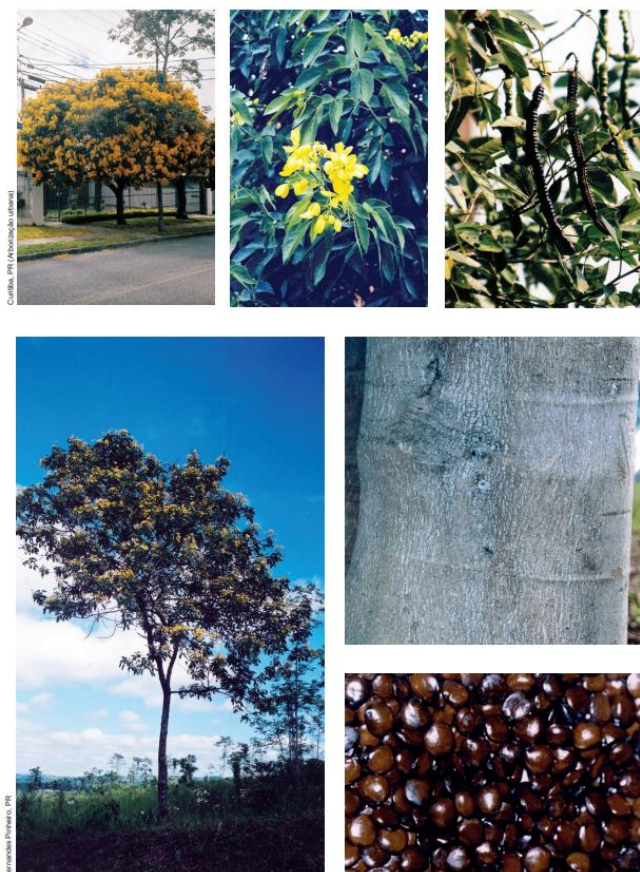
Espécies do gênero *Senna* são conhecidas pela sua utilização popular em algumas regiões da Índia, Ásia e África, como laxativos e purgativos. Estudos farmacológicos de algumas espécies comprovaram sua propriedade antibacteriana (SAMY et al, 2000), antifúngica (PALAMICHAMY e NAGARAGAN, 1990), anti-inflamatória (CUELLAR et al, 2001), hepatoprotetora (JAFRI et al, 1999) e antimalárica (TONA et al, 1999), o que demonstra o potencial farmacológico deste gênero vegetal.

1.3.1 *Senna macranthera*

Senna macranthera (Collad.) H.S. Irwin & Barneby, sinônima de *Cassia speciosa* var. *nervosa* (Vogel) Betham, é uma planta nativa do Brasil conhecida popularmente como manduirana, bolão-de-ouro, pau fava, mamangá e fedegoso. Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, é amplamente distribuída nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, ocorrendo principalmente em formações florestais ombrófilas e estacionais. Também pode aparecer em áreas de Cerrado, Caatinga e Campos Rupestres. É muito utilizada para arborização urbana, principalmente em zonas urbanas da região sul, devido ao pequeno porte e suas características ornamentais, principalmente devido às flores amarelas. Além de se prestar à composição de plantios em áreas degradadas por ser espécie pioneira e de rápido crescimento e por fim usada também na carpintaria na fabricação de caixotaria leve, confecções de brinquedos, e como lenha e carvão (LORENZI, 1992).

Caracteriza-se por ser uma árvore ou arbusto de 3 a 15 m de altura com ramos, raque foliar e folíolos densos e aos pares, flores de coloração amarela, muito vistosa e em cachos; fruto legume bacoide; sementes alojadas em “câmaras” separadas por falsos septos e embebidas em polpa fétida (IRWIN e BARNEBY, 1982). As características podem ser vistas na Figura 4.

Figura 6 - Fotografias de *Senna macranthera*. Uso na arborização urbana, ocorrência natural, inflorescência, fruto, tronco e sementes.



Fonte: Carvalho (2006).

Dado a variedade de aplicações biológicas encontradas para as diferentes espécies do gênero *Senna*, esse trabalho propôs o isolamento e caracterização dos principais metabólitos dos galhos de *S. macranthera*, bem como a realização de testes biológicos in vitro de tais compostos para avaliação de atividade anti-Trypanosoma cruzi.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo o isolamento e caracterização estrutural de substâncias da espécie vegetal *S. macranthera*, por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, para a avaliação frente atividade antiparasitária, especificamente em relação as formas tripomastigostas de *T. cruzi*, além de toxicidade frente a células de mamíferos.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção do extrato hexânico a partir dos galhos de *Senna macranthera*.
- Fracionamento e purificação dos principais metabólitos empregando diferentes técnicas cromatográficas;
- Caracterização estrutural das substâncias isoladas por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas contra as formas tripomastigostas de *Trypanosoma cruzi*, além de toxicidade frente a células de mamíferos do tipo NCTC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

A moagem dos galhos de *S. macranthera* foi realizada em um moinho de facas, modelo tipo Willey, da ACB Labor.

A concentração dos extratos e frações foi realizada em um sistema de rotaevaporação da marca Büchi, modelo R-215, munido de controlador de vácuo modelo I-300 e bomba de diafragma modelo V-300.

As placas cromatográficas foram reveladas em câmara escura UV da marca Sppencer, com comprimento de onda ajustável em 254 e 365 nm.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados no espectrômetro Varian – modelo INOVA 500, operando respectivamente a 500 Mz e 125 MHz, com tetrametilsilano (TMS) como referência interna, da Central Experimental Multiusuário (CEM) da UFABC. Os espectros foram processados no software MNova v. 14.0.0-23239, da Mestrelab Research S. L.

3.2 Materiais

3.2.1 Solventes

Para os processos de extrações, eluições cromatográficas de colunas e placas foram utilizados solventes da marca CAAL® (Casa Americana de Artigos para Laboratórios). 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

Para as separações com coluna cromatográfica (CC) gravitacional utilizada foram utilizadas como fase estacionária: sílica gel 60 (0,063-0,200 mm - Merck®) ou Sephadex® LH-20, da GE Healthcare®. Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foi utilizado para a fase estacionária cromatofolhas de sílica gel 60, de 0,1 mm espessura da marca Macherey-Nagel®.

3.2.3 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado e identificado pelo botânico Guilherme de Medeiros Antar do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em cujo herbário foi depositada uma exsicata sob a identificação de ANTAR 2910.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Extração

Aproximadamente 700 g de galhos de *S. macranthera* foram moídos, o material vegetal foi então submetido à extração a frio com hexano (3 x 2,5 L) obtendo-se 1,2 g de extrato hexânico após evaporação do solvente sob pressão reduzida.

4.2 Fracionamento cromatográfico

O extrato hexânico foi submetido 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, aproximadamente 1,0 g do extrato foi submetido a fracionamento por meio de cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária 275 g de sílica gel. Como fase móvel foram utilizadas misturas de Hexano:Acetato de Etila nas proporções 8:2, 7:3, 6:4, 1:1 e finalizado com metanol puro. Esse processo forneceu 54 frações, com volume aproximado de 50 mL cada, que foram analisadas por CCD. Após a revelação sob luz ultravioleta, as frações foram reunidas de acordo com similaridade em 18 grupos, como vistos na tabela 1. Estes grupos foram identificados com a sigla SMGH (*S. macranthera* galhos hexânico).

Tabela 1 - Grupos formados após o fracionamento do extrato hexânico de *S. macranthera*.

Grupos	Frações	Massa (mg)
SMGH 1	1-3	5,1
SMGH 2	4-5	302,6
SMGH 3	6	37,0
SMGH 4	7	33,1
SMGH 5	8	13,8
SMGH 6	9-10	11,9
SMGH 7	11-12	86,1
SMGH 8	13-16	14,3
SMGH 9	17-19	34,6
SMGH 10	20	32,7
SMGH 11	21-22	66,0
SMGH 12	23	17,0
SMGH 13	24-25	12,4
SMGH 14	26-30	56,7
SMGH 15	31-34	47,9
SMGH 16	35-39	53,1
SMGH 17	40-43	14,0
SMGH 18	44-54	124,8

Por conseguinte, todos os grupos foram submetidos a análises espectrais de RMN de ^1H , e os grupos SMGH 10, 11 e 12 mostraram-se constituído pelo β -sitosterol.

Por outro lado, os grupos SMGH 7 e 8 mostraram também sinais característicos de esteroides, mas foram escolhidos para serem novamente fracionados. Dessa forma, esses dois grupos foram reunidos e 90 mg foram submetidos a fracionamento por meio de cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária Sephadex-LH20. Como fase móvel foi utilizado

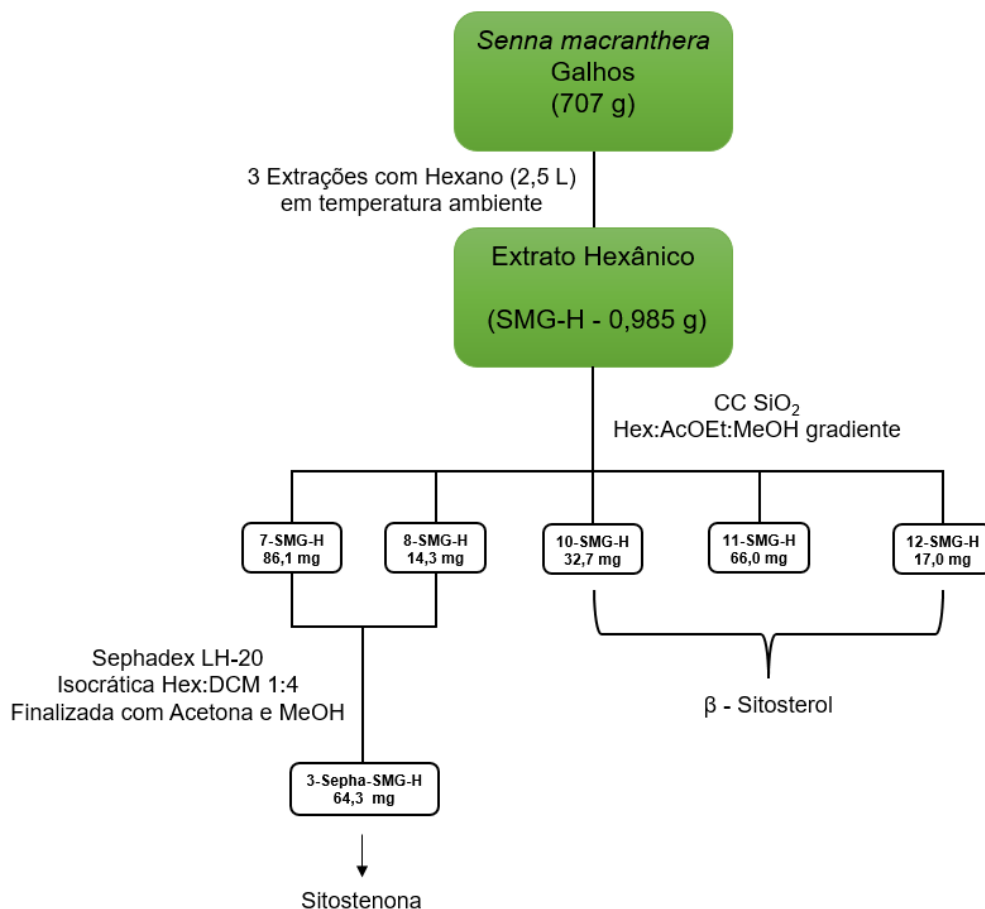
um sistema de eluição isocrático de mistura de Hexano:Diclorometano na proporção 1:4 e finalizado com acetona pura. Esse processo forneceu 25 frações, com volume aproximado de 50 mL cada, que foram analisadas por CCD. Após a revelação sob luz ultravioleta, as frações foram reunidas de acordo com similaridade em 7 grupos, identificados como SMGHS, como vistos na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos formados após o fracionamento das frações SMGH 7 e 8.

Grupos	Frações	Massa (mg)
SMGHS 1	1	3,3
SMGHS 2	2-9	10,0
SMGHS 3	10-13	64,3
SMGHS 4	14-16	4,6
SMGHS 5	17-18	0,8
SMGHS 6	19	3,1
SMGHS 7	20-25	22,1

Novamente, todos os grupos foram submetidos a análises espectrais de RMN de ^1H , e foi verificado a presença de Sitostenona no grupo SMGHS 3. Todo o procedimento de extração e fracionamento cromatográfico para o isolamento das substâncias é reunido no fluxograma apresentado na figura 7.

Figura 7 – Fluxograma do processo de extração e isolamento das substâncias trabalhadas.



Fonte: Autoria própria

4.3 Ensaios Biológicos in vitro

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Os procedimentos descritos a seguir foram realizados sob a colaboração e supervisão do Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

4.3.1 Parasitas

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em culturas celulares LLCMK2 (células epiteliais de rim de *Macaca mulata* – 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, REIMÃO et al., 2010).

4.3.2 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 CO₂ (CORRÊA et al., 2011).

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

Os compostos isolados, β -sitosterol e sitostenona, foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e incubados com os parasitas para se determinar as respectivas CE₅₀. 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 CO₂ 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. Ao final do ensaio, foi realizada a leitura da placa por absorbância 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 vivas), foram utilizadas as células não tratadas.

4.3.4 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 os compostos isolados, e foi feita uma diluição seriada dos compostos com meio M-199 e 10% de SFB 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 μ L 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 Índice de Seletividade (IS) foi determinado usando a seguinte relação: CC₅₀ / CE₅₀ (TEMPONE et al., 2005).

4.3.5 Análise estatística

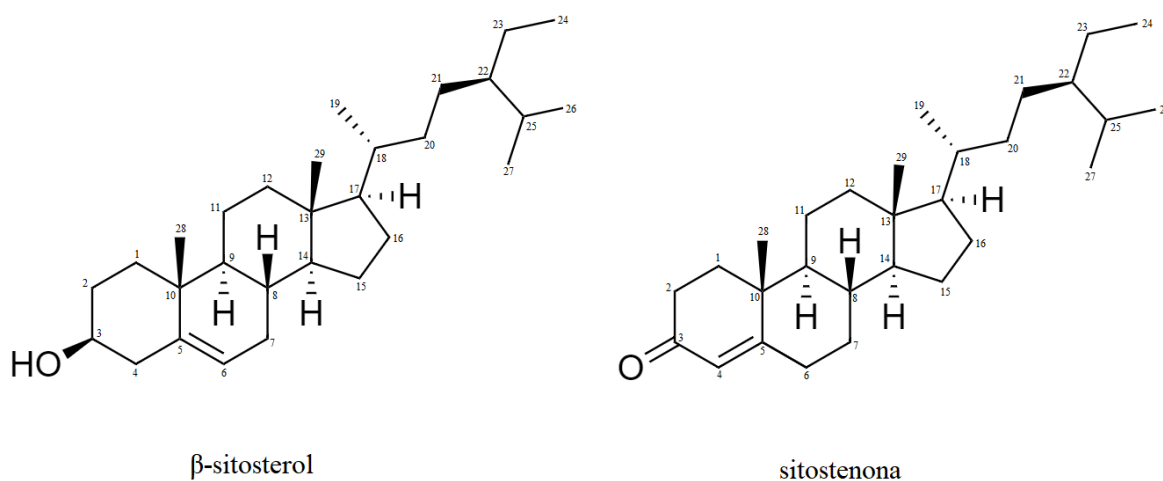
Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras duplicadas de dois ensaios independentes. Os valores de CE_{50} foram calculados usando curvas sigmoide dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0, com intervalos de confiança de 95%. O teste de Mann – Whitney foi utilizado para teste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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural

Através das técnicas cromatográficas foram obtidos os compostos isolados - β -sitosterol e Sitostenona - das folhas dos galhos de *Senna macranthera*, cujas estruturas podem ser vistas na figura 8 e seus processos de identificação estrutural estão descritos na sequência.

Figura 8 – Estrutura química do β -sitosterol e sitostenona.



Fonte: Autoria própria, realizado pelo Chem Draw.

O espectro de RMN de ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) do β -sitosterol (Anexo 1) apresentou alta complexidade em diversos sinais sobrepostos entre δ 0,5 e δ 3,0. Destes sinais, foram observados dois simpletos em δ 0,67 e 1,03 confirmando a presença de grupos metílicos (H-29 e H-28) ligados a carbonos quaternários. O multiplete em δ 3,51 foi atribuído ao H-3 ao passo que o tripleto em δ 5,37 foi atribuído ao H-6 olefínico.

O espectro de RMN de ^{13}C (δ , 125 MHz, CDCl_3) do β -sitosterol (Anexo 4) apresentou sinais em δ 140,8 e δ 121,7 que são atribuídos a carbonos de ligação dupla, ou seja, C-5 e C-6, respectivamente. O sinal em δ 71,8 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-3), enquanto que os sinais em δ 11,9; 12,0; 19,1; 19,4 e 19,8 foram atribuídos a carbonos metilílicos C-29, C-24, C-27, C-28 e C-26 respectivamente. Os demais dados de deslocamento químico para os carbonos e hidrogênios da molécula em comparação com a literatura são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados espectroscópios de RMN de ^1H e ^{13}C do β -sitosterol (δ , 500 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (ODODO et al., 2016).

Posição	δ_{H} (mult.)	δ_{H} literatura (mult.)	δ_{C}	δ_{C} literatura
1	1,46 (m)	1,46 (m)	37,3	37,3
2	1,56 (m)	1,56 (m)	31,6	31,7
3	3,51 (m)	3,54 (m)	71,8	71,8
4	2,25 (m)	2,32 (m)	42,3	42,3
5	-	-	140,8	140,8
6	5,34 (t)	5,37 (t)	121,7	121,7
7	1,99 (m)	2,04 (m)	31,9	31,9
8	1,65 (m)	1,69 (m)	31,9	31,9
9	1,55 (m)	1,55 (m)	50,2	50,2
10	-	-	36,5	36,5
11	1,54 (m)	1,52 (m)	21,1	21,1
12	1,52 (m)	1,51 (m)	39,8	39,8
13	-	-	42,3	42,3
14	1,48 (m)	1,50 (m)	56,8	56,8
15	1,58 (m)	1,58 (m)	24,3	24,3
16	1,84 (m)	1,85 (m)	28,2	28,3
17	1,43 (m)	1,45 (m)	56,1	56,1
18	1,59 (m)	1,60 (m)	36,1	36,2
19	0,91 (d)	0,94 (d)	18,8	18,8
20	0,91 (m)	0,93 (m)	34,0	34,0
21	1,15 (m)	1,15 (m)	26,1	26,1
22	1,41 (m)	1,38 (m)	45,8	45,9
23	1,10 (m)	1,10 (m)	23,1	23,1
24	0,80 (t)	0,82 (t)	12,0	12,0
25	1,57 (m)	1,57 (m)	29,2	29,2
26	0,82 (d)	0,84 (d)	19,8	19,8
27	0,84 (d)	0,86 (d)	19,1	19,1
28	1,03 (m)	1,03 (m)	19,4	19,4
29	0,67 (s)	0,70 (s)	11,9	11,9
OH	1,95 (s)	1,98 (s)	-	-

O espectro de RMN de ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) da Sitostenona (Anexo 5) apresentou dentre outros sinais, dois simpletos em δ 0,71 e 1,17 atribuídos a H-29 e H-28, respectivamente. Além desses, um simpleto em δ 5,72, sugere a presença de hidrogênio ligados a carbono sp^2 sendo atribuído a H-4.

O espectro de RMN de ^{13}C (δ , 125 MHz, CDCl_3) da Sitostenona (Anexo 7) apresentou sinais em δ 171,7 e δ 123,7 atribuídos aos átomos de carbono C-4 e C-5. A desproteção observada para o sinal de C-5 em relação a outros carbonos do tipo sp^2 , é indicativo da ocorrência de um sistema α,β -insaturado o que permitiu o posicionamento de um grupo carbonílico em C-3 confirmado pela presença do sinal em δ 199,6. Além disso, os sinais em δ 11,9; 12,0; 17,4; 19,0 e 19,8 foram atribuídos a carbonos metilílicos C-29, C-24, C-28, C-27 e C-26 respectivamente.

Os demais dados de deslocamento químico para os carbonos e hidrogênios da molécula em comparação com a literatura são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados espectroscópios de RMN de ^1H e ^{13}C da Sitostenona (δ , 500 MHz, CDCl_3) e dados na literatura (LEE et al., 2010).

Posição	δ_{H} (mult.)	δ_{H} literatura (mult.)	δ_{C}	δ_{C} literatura
1	1,99 - 2,05 (m)	2,00 - 2,06 (m)/ 1,62 - 1,75 (m)	35,7	35,7
2	2,23 - 2,45 (m)	2,20 - 2,38 (m)	34,0	34,0
3	-	-	199,6	199,5
4	5,72 (s)	5,73 (s)	123,7	123,7
5	-	-	171,7	171,5
6	2,23 - 2,45 (m)	2,20 - 2,38 (m)	32,9	32,9
7	0,99 - 1,05 (m)/ 1,81-1,89 (m)	0,99 - 1,05 (m)/ 1,83 - 1,93 (m)	32,0	32,1
8	1,20-1,61 (m)	1,43 - 1,62 (m)	35,6	35,6
9	0,89 - 0,97 (m)	0,87 - 0,97 (m)	53,8	53,8
10	-	-	38,6	38,6
11	1,20-1,61 (m)	1,11 - 1,41 (m)/ 1,43 - 1,62 (m)	21,0	21,0
12	1,99 - 2,05 (m)	2,00 - 2,06 (m)	39,6	39,6
13	-	-	42,4	42,4
14	0,99 - 1,05 (m)	0,99 - 1,05 (m)	55,9	55,9
15	1,20-1,61 (m)/ 1,81-1,89 (m)	1,11 - 1,41 (m)/ 1,83 - 1,93 (m)	28,2	28,2
16	1,20-1,61 (m)	1,11 - 1,41 (m)/ 1,43 - 1,62 (m)	24,2	24,2
17	1,20-1,61 (m)	1,11 - 1,41 (m)	56,0	56,0
18	1,20-1,61 (m)	1,11 - 1,41 (m)	36,1	36,1
19	0,91 (d)	0,94 (d)	18,7	18,7
20	1,08 - 1,15 (m)	1,11 - 1,41 (m)	33,9	33,9
21	1,08 - 1,15 (m)	1,11 - 1,41 (m)	26,1	26,1
22	0,99 - 1,05 (m)/ 1,20-1,61 (m)	0,99 - 1,05 (m)/ 1,62 - 1,75 (m)	29,1	29,2
23	1,08 - 1,15 (m)	1,11 - 1,41 (m)	23,1	23,1
24	0,85 (s)	0,85 (s)	12,0	12,0
25	0,89 - 0,97 (m)	0,87 - 0,97 (m)	45,8	45,9
26	0,82 (d)	0,83 (s)	19,8	19,8
27	0,84 (d)	0,81 (s)	19,0	19,0
28	1,17 (s)	1,19 (s)	17,4	17,4
29	0,71 (s)	0,72 (s)	11,9	11,9

5.2 Ensaio Biológico

Os compostos isolados, β -sitosterol e Sitostenona foram avaliados quanto ao seu potencial antiparasitário frente a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Além disso, a toxicidade desse composto (CC_{50}) foi determinada frente a células NCTC. Desta forma, os dados reunidos e comparados com o controle positivo (Benzonidazol) são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Efeito antiparasitário dos compostos isolados de *Senna macranthera* frente a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

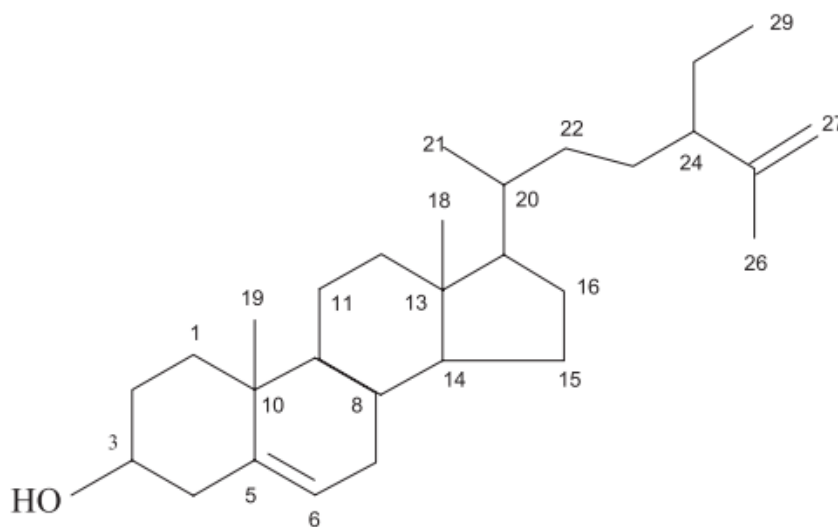
Composto	CE ₅₀ (μM) (95% IC)	CC ₅₀ (μM) (95% IC)	IS
β -sitosterol	> 150	> 200	-
sitostenona	19,3 ± 4,6	> 200	> 10,4
Benzonidazol*	16,2 ± 3,7	> 200	> 12,3

CE₅₀: Concentração efetiva a 50%; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% (células NCTC); 95% IC: Intervalo de confiança a 95%; IS: Índice de Seletividade; *Fármaco padrão.

A sitostenona mostrou-se ativa frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com valores muito próximos de concentração efetiva (CE₅₀) do fármaco padrão (Benzonidazol), CE₅₀ = 16,2 μM, com um índice de seletividade também similar (> 10,4 vs > 12,3). O β -sitosterol, apesar de ter uma estrutura muito similar a sitostenona, não apresentou atividade (CE₅₀ > 150), entretanto ambos compostos isolados apresentaram baixa toxicidade frente as células de mamífero.

Um estudo realizado por SARTORELLI et. al, 2007, mostrou que o esteroide clerosterol (figura 9) possui atividade antiparasitária. Apesar de ser outro parasita, o clerosterol mostrou-se ativo contra as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*, e esse composto difere apenas do β -sitosterol quanto a uma ligação dupla na cadeia lateral. Quando comparado essa informação com a da atividade antiparasitária obtida para o β -sitosterol e a sitostenona, sugere-se que apenas uma mudança na cadeia lateral da estrutura pode resultar em uma atividade antiparasitária. Portanto, é sugerido que o sistema carbonílico e possivelmente a dupla ligação em um sistema conjugado presente na sitostenona é responsável por sua atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Figura 9 – Estrutura química do clerosterol.



Fonte: Adaptado de SARTORELLI (2007).

Esses resultados apontam que pequenas mudanças estruturais na estrutura desses esteroides são suficientes para grande alteração de sua atividade e permanecendo com baixa toxicidade, sendo dessa forma ótimos pontos de partida como protótipos moleculares para o desenvolvimento de possíveis fármacos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível o isolamento dos esteroides identificados como β -Sitosterol e sitosenona do extrato hexânico dos galhos de *Senna macranthera*. A caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C comparada com dados da literatura permitiram a identificação dos compostos. Os compostos isolados foram avaliados quanto ao seu potencial antitripanosomal, no qual foi verificada atividade biológica frente a forma tripomastigota de *T. cruzi* para a Sitostenona, mas o β -Sitosterol mostrou-se inativo, apesar de ambos compostos apresentaram uma baixa toxicidade, sugerindo, portanto, que a presença do sistema conjugado com o grupo carbonílico deve ter importância para a atividade biológica. Sendo assim a Sitostenona se mostra com um grande potencial para uma maior exploração da atividade biológica a partir de derivados a fim de encontrar um composto ideal que resulte em novos medicamentos frente a essa doença tropical negligenciada, a Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTA, S. C et al.; **Plantas medicinais: cultura popular versus ciência**. Vivências, v. 7, n. 12, p. 51- 60, 2011.
- BERLINCK, R. G. S. **A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI**. Química Nova, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 10 p.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Espécies arbóreas brasileiras Vol. 2** (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, 5 volumes). 1 ed. Colombo (PR). Embrapa Florestas, 2006.
- CASTRO, J.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis)**. Human & Experimental Toxicology, [s.l.], v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.
- 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.
- CORREIA, J. R. et al. **Doença de Chagas: aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos**. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 13, n. 3, p. e6502, 2021.
- CUELLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ S.; RÍOS J. L. **Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders**. Fitoterapia, v. 72, p. 221-229, 2001.
- DIAS, J. C. P. et al. **II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2016**. Epidemiol. serv. Saúde, v. 24, n. 1, p. 7-86, 2016.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. 486 p.
- 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.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. **The American Cassiinae – A synoptical revision of Leguminosae - Tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World**. Memoirs of The New York Botanical Garden, v. 35, p. 1-918, 1982.
- JAFRI, M. A., SUBHANI, M. J.; JAVED, K.; SINGH, S. **Hepatoprotective activity of leaves of Cassia occidentalis against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats**. Journal of Ethnopharmacology, v. 66, p. 355-361, 2009.

JÚNIOR, M. S. M. et al. **Avaliação da atividade tripanocida in vitro dos triterpenos uvaol, ácido betulínico e seus derivados semissintéticos contra a cepa Y de Trypanosoma cruzi**. Brazilian Journal of Development, v.7, n. 9, p. 90504–90517, 2021.

JURBERG, J. et al. **Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas)**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2014. 58 p.

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.

KROPF, S.P., and LACERDA, A.L. **Carlos Chagas, um cientista do Brasil = Carlos Chagas, scientist of Brazil** [online]. Translated by Diane Grosklaus Whitty. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009, 306 p.

LEE, Jun et al. **Scopoletin from the flower buds of Magnolia fargesii inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis ex vivo**. Archives of Pharmacal Research, v. 33, n. 9, p. 1317-23, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum Ltda. p. 152, 1992.

MARTINS-MELO, F.R et al. **Mortality from neglected tropical diseases in brazil, 2000-2011**. Bull World health organ, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2016.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial**. Bol Epidemiol [Internet]. 2020 abr; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014**. Journal of Natural Products, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019**, J. Nat. Prod., v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

ODODO, M.M., CHOUDHURY, M.K. & DEKEBO, A.H. **Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora***. Springer Plus, v. 5, p. 1210, 2016.

Organização Mundial da Saúde. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>> Acesso em: 10 de out. de 2022.

PALAMICHAMY, S.; NAGARAGAN, S. **Antifungal activity of Cassia alata leaf extract**. Journal of Ethnopharmacology, v. 29, p. 337, 1990.

PINTO, A.C. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. Química Nova, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

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.

RIBEIRO, A. et al. **Análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato foliar de *Cariniana estrellensis*.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 9, n. 4, p. 309–316, 2021.

SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S. **Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India.** Journal of Ethnopharmacology, v. 69, p. 63-71, 2000.

SARTORELLI, P. et al. **Isolation of Antileishmanial Sterol from the Fruits of *Cassia fistula* using Bioguided Fractionation.** Phytotherapy Research, v. 21, p. 644-647, 2007.

TEMPONE, A. G. et al. **Antitptotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families.** Phytomedicine, v. 12, n.5, p. 382-390, 2005.

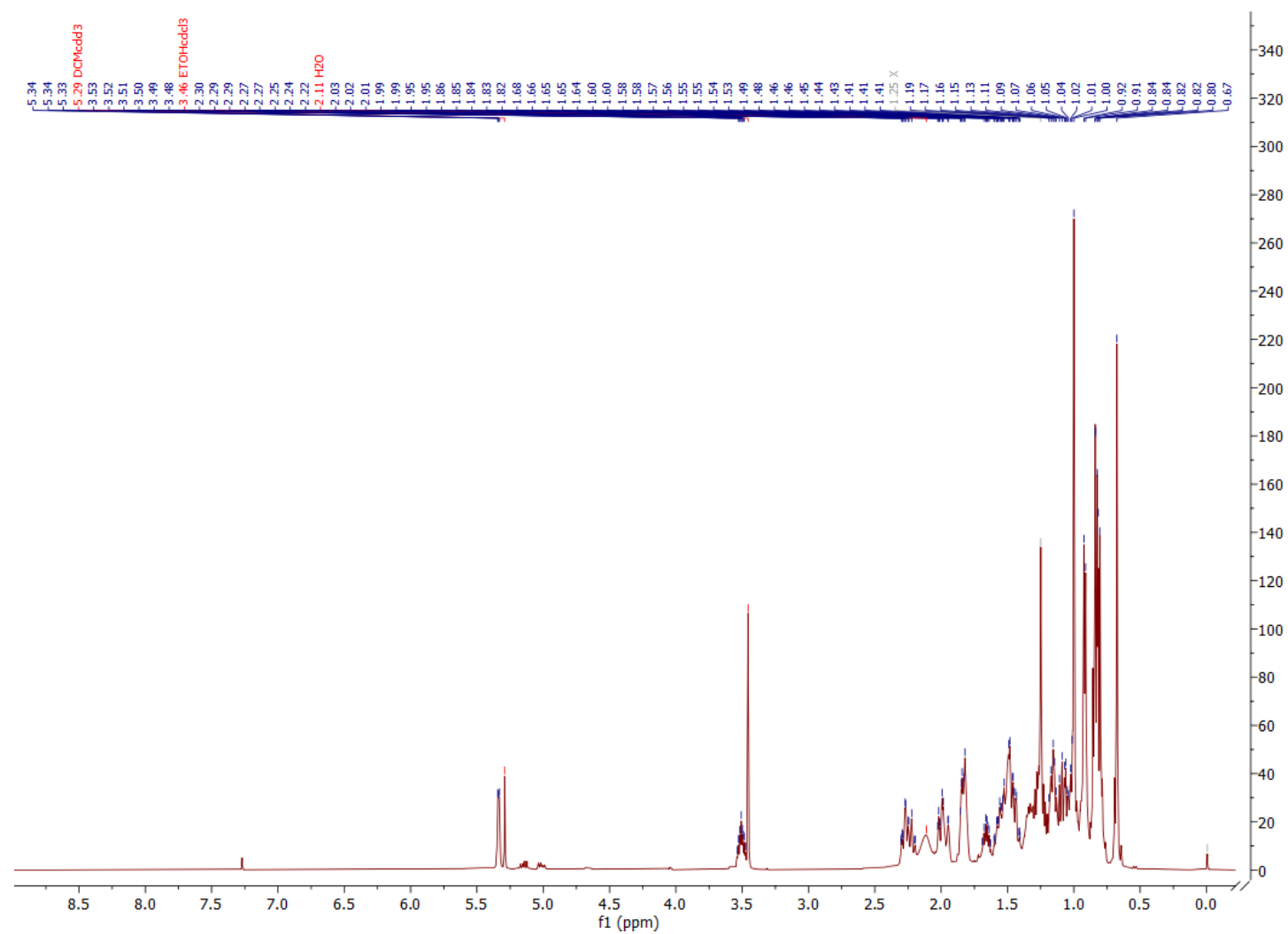
TONA, L. et al. **Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa.** Congo Journal Ethnopharmacology, v. 68, n. 1-3, p. 193-203, 1999.

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

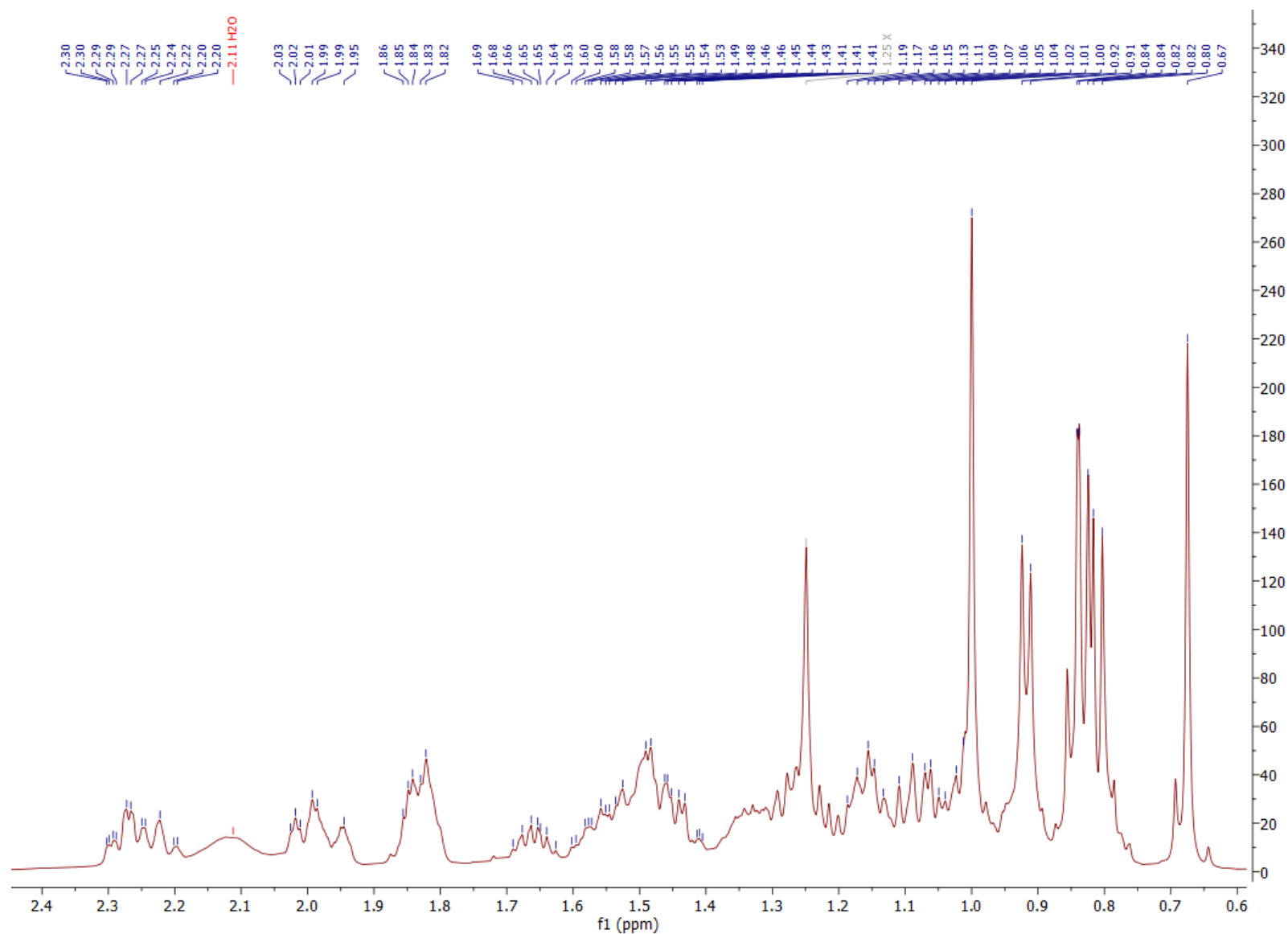
VIEGAS JR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I., BOLZANI V.S. **Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*.** Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

ANEXOS

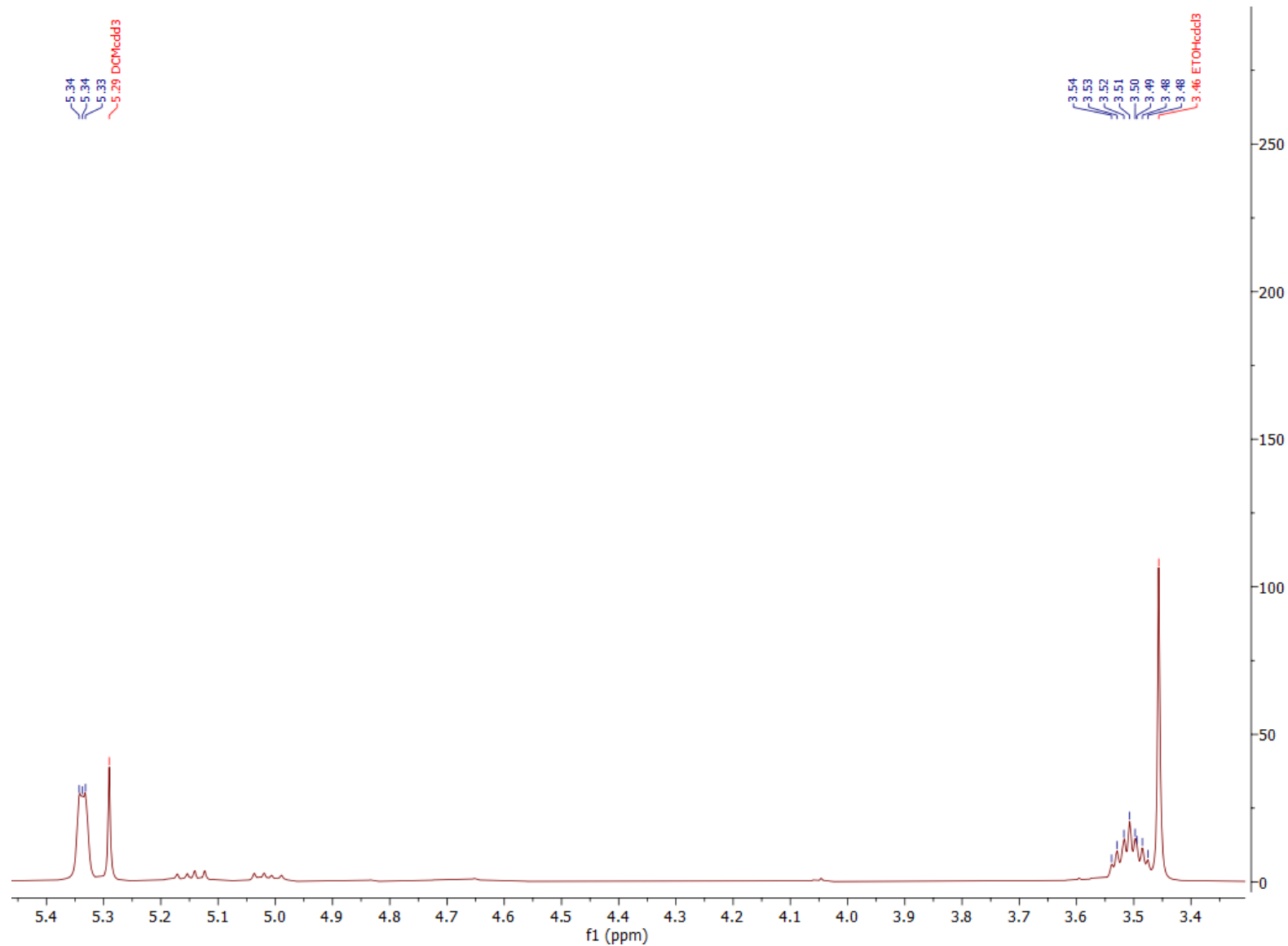
Anexo 1 – Espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do β -sitosterol.



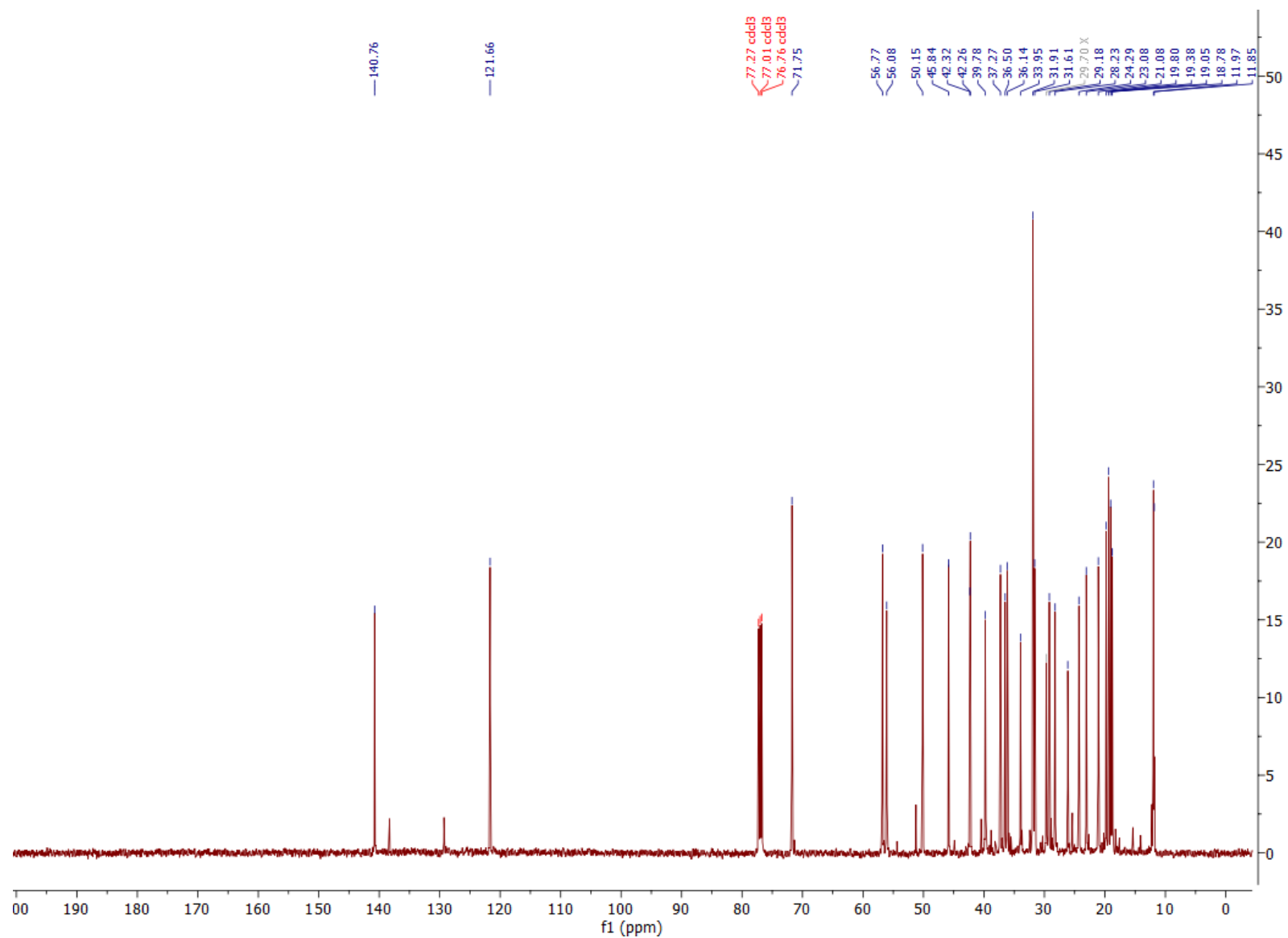
Anexo 2 – Ampliação na região δ 0,6 – 2,4 do espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do β -sitosterol.



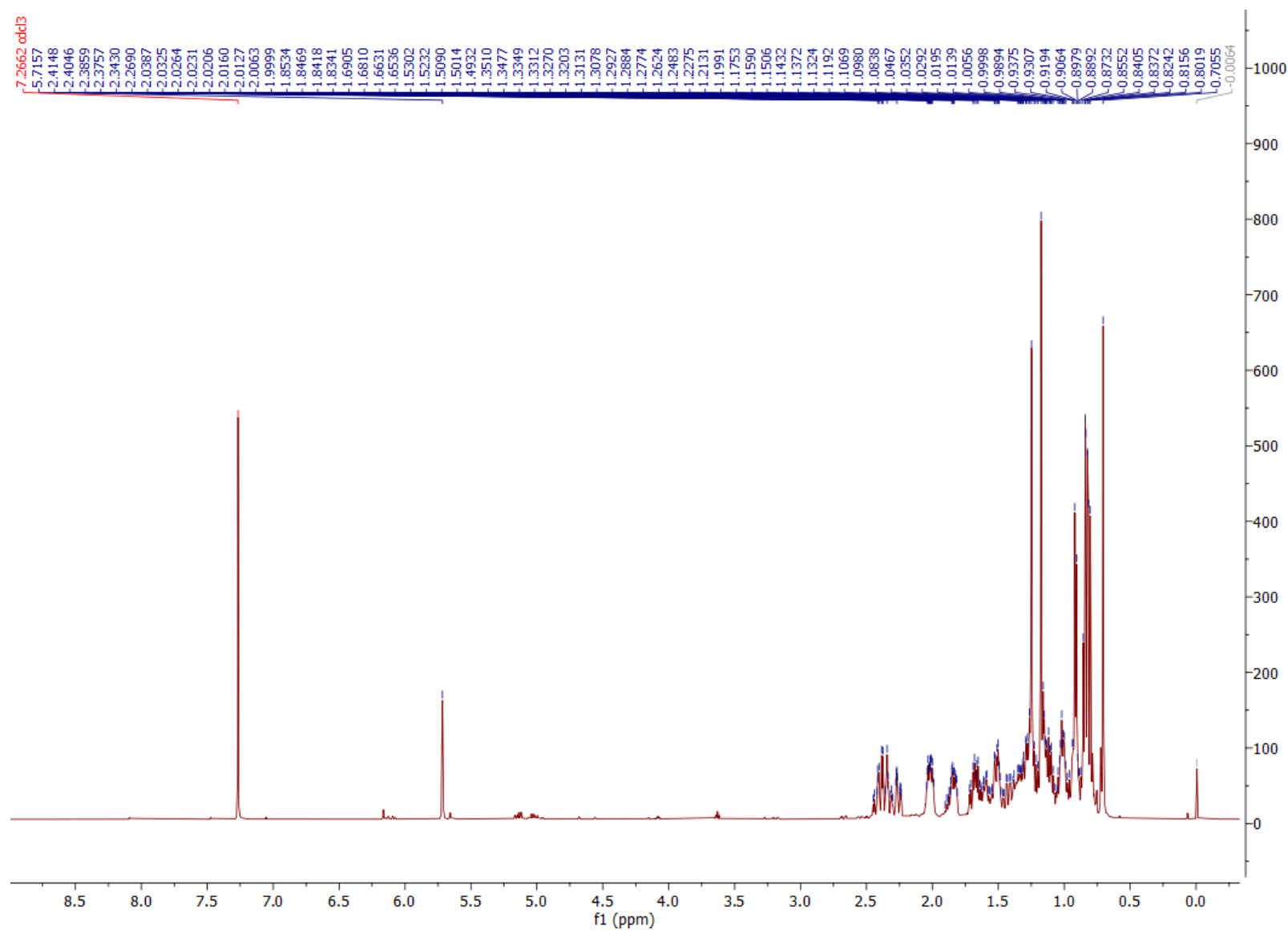
Anexo 3 – Ampliação na região δ 3,4 – 5,4 do espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do β -sitosterol.



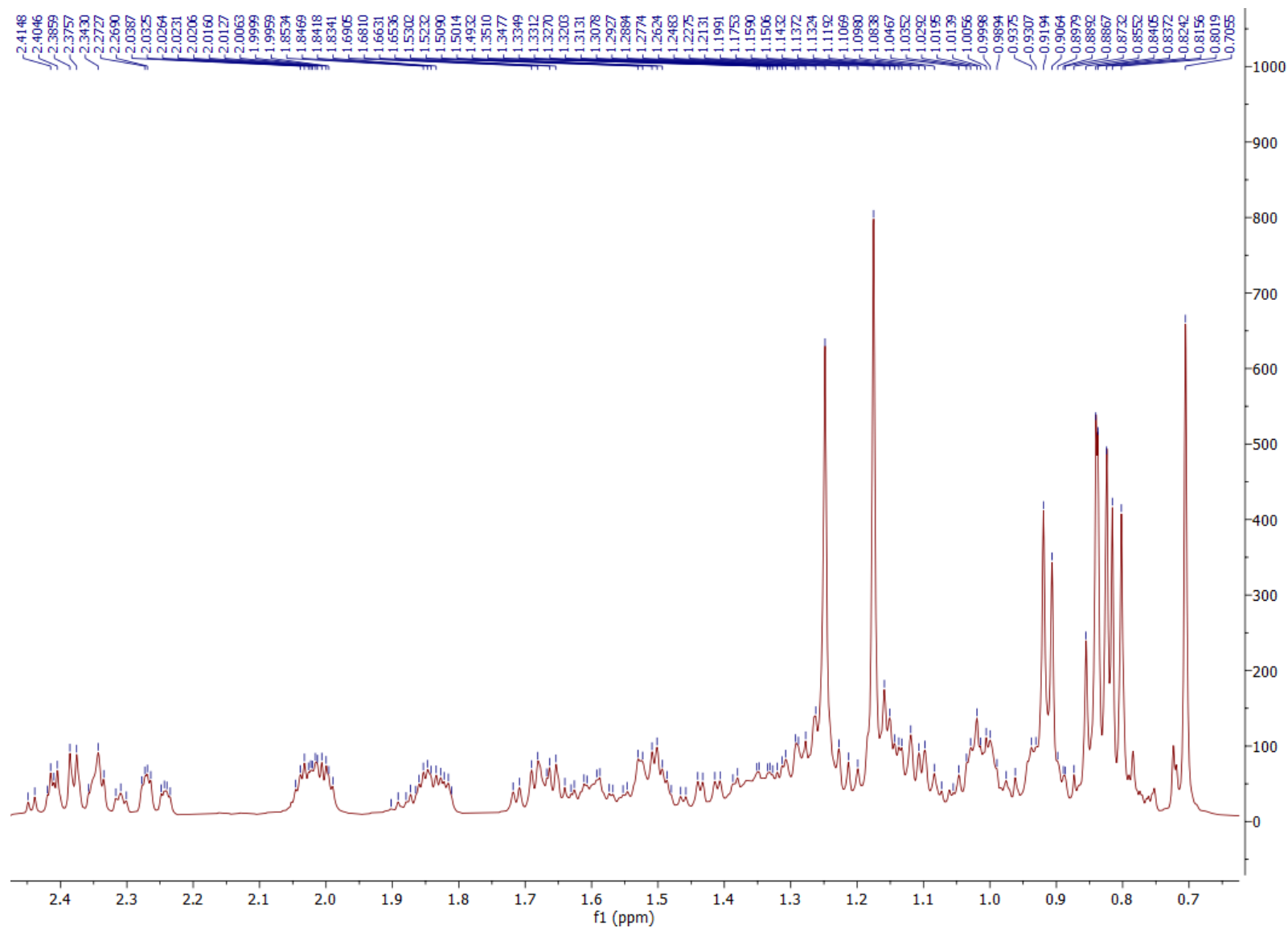
Anexo 4 – Espectro de RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) do β -sitosterol.



Anexo 5 – Espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) da Sitostenona.



Anexo 6 – Ampliação na região δ 0,6 – 2,5 do espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) da Sitostenona.



Anexo 7 – Espectro de RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3 , 125 MHz) da Sitostenona.

