

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Nathália Florêncio Peres

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DO
(*E*)-p-CUMARATO DE TETRACOSILA ISOLADO A PARTIR
DAS FOLHAS DE *Baccharis mattogrosensis***

Santo André - SP

Novembro, 2022

NATHALIA FLORENCIO PERES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DO (E)-p-CUMARATO DE
TETRACOSILA ISOLADO A PARTIR DAS FOLHAS DE *Baccharis mattogrosensis***

Monografia de 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: Professor Dr. João Henrique
Ghilardi Lago.

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso de NATHALIA FLORENCIO PERES, realizada em 21 de novembro de 2022.

Professor Dr. João Henrique Ghilardi Lago
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Professor Dr. Artur Franz Keppler
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Professor Dr. Vani Xavier de Oliveira Júnior
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por terem insistido em me dar a melhor educação ainda que as condições fossem difíceis. Agradeço ao meu irmão por dividir essa existência comigo. Agradeço aos meus amigos pelo apoio nessa trajetória que começou com o técnico em química em 2011. Agradeço ao meu amor pelo apoio e pela paciência nesse processo.

Agradeço ao professor João por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e ter confiado este trabalho às minhas mãos. Agradeço ao grupo de pesquisa do laboratório 407-3, em especial, agradeço ao Anderson pela disposição e paciência, este trabalho existe graças a você.

Agradeço ao corpo docente do bacharelado em química da UFABC pela dedicação e por todo conhecimento transmitido.

Agradeço à Universidade Federal do ABC por me ensinar o que é ciência e porque é tão necessário defendê-la.

RESUMO

A Doença de Chagas figura entre as 20 doenças classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs), atingindo principalmente a parcela socialmente vulnerável da população do sul global. Estima-se que haja no Brasil, atualmente, pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da Doença de Chagas. Em 2020, portadores da fase crônica da doença foram considerados grupo de risco para a COVID-19 devido a complicações cardiovasculares. Atualmente, o tratamento da Doença de Chagas é limitado ao benzonidazol, fármaco em uso no Brasil desde a década de 70, conhecido por causar efeitos colaterais severos em pacientes, levando a interrupção do tratamento. Neste contexto, a busca por novos compostos, incluindo aqueles de fontes naturais, é crucial. As plantas do gênero *Baccharis* têm sido estudadas quanto à atividade antiparasitária, espécies como *B. retusa* e *B. sphenophylla* foram caracterizadas do ponto de vista fitoquímico e apresentaram compostos bioativos, incluindo diterpenos, flavonóides e cumaratos de alquila. O presente trabalho procura prospectar derivados bioativos da espécie *Baccharis matogrossensis*, planta endêmica do Brasil, cujo perfil fitoquímico ainda é inédito, e avaliar o potencial antiparasitário do composto purificado frente ao *Trypanosoma cruzi*. A partir do extrato hexânico das partes aéreas da *B. matogrossensis*, foi realizado o fracionamento por técnicas cromatográficas, fornecendo o (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila, cuja estrutura foi definida por espectroscopia de ressonância magnética e espectrometria de massas de alta resolução. O composto isolado foi testado *in vitro* frente às formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, apresentando CE_{50} de $17,8 \pm 4,2 \mu M$ e $14,5 \pm 4,4 \mu M$, respectivamente, e citotoxicidade $>200 \mu M$ para células do tipo NCTC. O índice de seletividade (IS) calculado para a forma tripomastigota foi de 11,2 e para forma amastigota 13,8, frente a esses resultados é possível inferir que o composto é tóxico para o parasita e não para o hospedeiro. Apesar de apresentar IS inferior ao benzonidazol para amastigotas, o composto se mostra promissor no estudo de novos fármacos para o tratamento de Doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, fitoquímica, *Baccharis matogrossensis*, atividade antiparasitária.

ABSTRACT

Chagas disease is among the 20 diseases classified by the World Health Organization (WHO) as Neglected Tropical Diseases (NTDs), mainly affecting the socially vulnerable portion of the population of the global south. In Brazil, at least one million people are infected with *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes Chagas disease. In 2020, patients with the chronic phase of Chagas Disease were considered a risk group for COVID-19 due to cardiovascular complications. The treatment of this disease is limited to benznidazole, a drug in use in Brazil since the 1970s, that has been causing severe side effects in patients, leading to discontinuation of treatment. In this context, searching for new compounds, including those from natural sources, is crucial. Plants of the genus *Baccharis* have been studied for antiparasitic activity, species such as *B. Retusa* and *B. Sphenophylla* were characterized from the phytochemical point of view and presented bioactive compounds, including diterpenes, flavonoids, and alkyl coumarates. The present work intends to characterize a compound isolated from the species *Baccharis mattogrossensis*, a plant endemic to Brazil, whose phytochemical study is unprecedented. And to evaluate the antiparasitic potential of the purified compound against *Trypanosoma cruzi*. From the hexane extract of aerial parts of *B. mattogrossensis*, fractionation was performed using chromatographic techniques, which provided the compound (*E*)-*p*-tetracosyl coumarate, whose structure was defined by magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of high resolution. The isolated compound was tested *in vitro* against trypomastigote and amastigote forms of *T. Cruzi*, presenting an EC₅₀ of $17.8 \pm 4.2 \mu\text{M}$ and $14.5 \pm 4.4 \mu\text{M}$, respectively, and cytotoxicity $>200 \mu\text{M}$ for NCTC cells. The selectivity index (SI) calculated for the trypomastigote form was 11.2, and 13.8 for the amastigote. Therefore, it is possible to infer that the compound is toxic to the parasite and not to the host. Despite having a lower SI than benznidazole for amastigotes, the compound is a promising possible drug for Chagas disease treatment.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, phytochemistry, *Baccharis matogrossensis*, antiparasitic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos de doença de Chagas aguda, segundo provável forma de transmissão. Brasil, 2020.	14
Figura 2. Distribuição do índice de vulnerabilidade para DCC, por UF e DF.	16
Figura 3. Estágios evolutivos do parasita <i>T. cruzi</i> .	18
Figura 4. Estruturas químicas do benzonidazol (direita) e nifurtimox (esquerda).	19
Figura 5. Estrutura dos p-cumaratos de p-cumarato de <i>n</i> -hexacosila, de <i>n</i> -octacosila e de <i>n</i> -triacontila isolados da <i>B. ligustrina</i>	20
Figura 6. Exemplar de <i>B. mattogrossensis</i> .	20
Figura 7 - Estrutura do (<i>E</i>)- <i>p</i> -cumarato de alquila.	26
Figura 8 - Espectro de RMN (δ / ppm, 300 MHz, CDCl ₃) de ¹ H da fração EHBM 7.	27
Figura 9 - Espectro de RMN (δ / ppm, 300 MHz, CDCl ₃) de ¹³ C da fração EHBM 7.	28
Figura 10. Espectro de massas da fração 7 de EHBM	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidades Federadas de infecção. Brasil, 2020.	15
Tabela 2. Grupos formados após o fracionamento do EHBM	23
Tabela 3 - Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto isolado comparados com dados espectrais de ácido.	26
Tabela 4. Efeito antiparasitário do composto isolado (<i>E</i>)-p-cumarato de tetracosila frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .	30
Tabela 5. Comparação entre atividade antiparasitária de derivados alquílicos do ácido p-cumárico.	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AcOEt – Acetato de Etila

CC₅₀ – Concentração Citotóxica a 50%

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CE₅₀ – Concentração Efetiva a 50%

DMSO – Dimetilsufóxido

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

d – Duplete

DDC - Doença de Chagas

FH – Fase hexânica

J – Constante de acoplamento

m - Multiplete

mult. - Multiplicidade

MeOH – Metanol

mg – Miligramas

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

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

– Deslocamento Químico (ppm)

λ – Comprimento de onda (nm)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas	12
1.1.1 Doença de Chagas	12
1.1.2 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.1.3 Benzonidazol	18
1.2 Gênero <i>Baccharis</i> e o potencial farmacológico	19
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Materiais	21
3.1.1 Solventes	21
3.1.2 Cromatografia	21
3.1.3 Material vegetal	22
3.2 Métodos	22
3.2.1 Extração	22
3.2.2 Fracionamento cromatográfico	22
3.2.3 Determinação da atividade antiparasitária	23
3.2.4 Determinação da citotoxicidade	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Identificação estrutural do p-cumarato	25
4.2 Avaliação da atividade antiparasitária	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

A prospecção de novos fármacos para doenças conhecidas é um importante campo de estudo da bioquímica, pois busca minimizar possíveis efeitos colaterais das drogas utilizadas no mercado, aumentar a eficácia, otimizar o processo de produção, reduzir os custos e, por consequência, ampliar o acesso da população ao tratamento de qualidade. A busca por compostos bioativos para tratamento de doenças com altas taxas de mortalidade em países desenvolvidos, como câncer é alta, por outro lado pesquisas voltadas para doenças que afetam países em desenvolvimento são mais escassas. (Sung, et al, 2021; Chatelain e Ioset, 2022).

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo variado de 20 doenças que são majoritariamente predominantes em áreas tropicais e que afetam principalmente a parcela mais pobre e socialmente vulnerável da população. São consideradas DTNs pela OMS: úlcera de Buruli, doença de Chagas, dengue e chikungunya, dracunculíase (doença do verme da Guiné), equinococose, tripanossomíase africana (doença do sono), leishmaniose, hanseníase, filariose linfática (elefantíase), micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, oncocercose (cegueira dos rios), raiva, escabiose e outras ectoparasitoses, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, envenenamento por picada de cobra, teníase/cisticercose, tracoma, boubá e outras treponematoses endêmicas. Juntas, as DTN afetam cerca de 2 bilhões de pessoas, incluindo 0,5 bilhões de crianças, e são responsáveis por causar aproximadamente 200.000 mortes por ano (Álvarez-Hernández, *et al.* 2020).

São consideradas negligenciadas devido ao baixo investimento por parte da grande indústria farmacêutica na produção de medicamentos, uma vez que estão relacionadas às regiões mais pobres do globo, o que limita o retorno financeiro (Álvarez-Hernández, *et al.* 2020).

1.1.1 Doença de Chagas

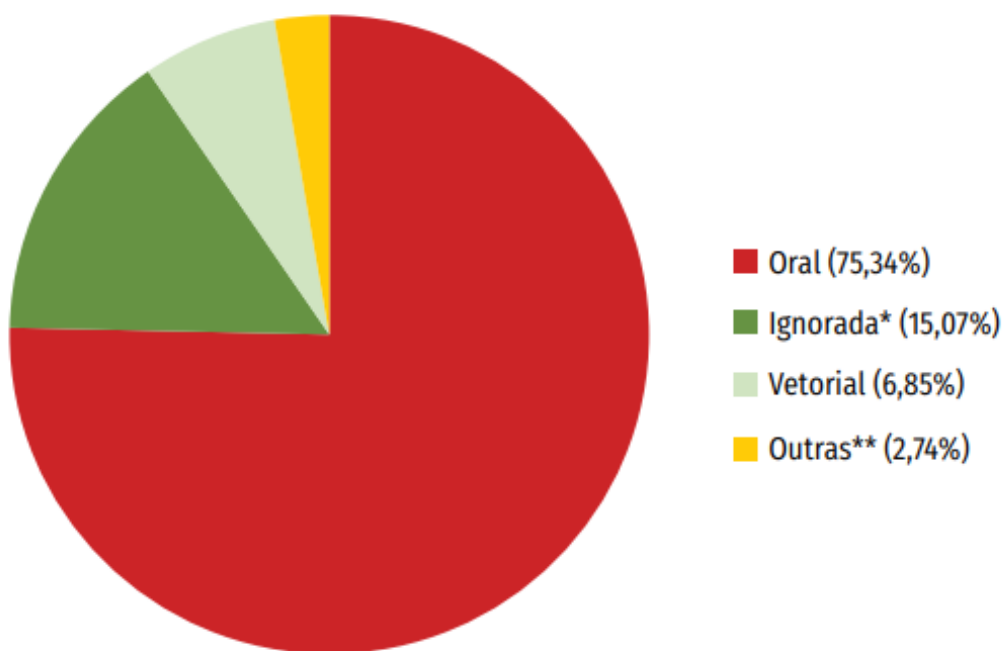
A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que apresenta índice de mortalidade expressivo. Apresenta-se clinicamente em duas fases distintas, a aguda e a crônica, esta última podendo manifestar-se nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Ministério da Saúde, 2022).

Estima-se que cerca de seis a sete milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com *T. cruzi*. A doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina onde tem sido transmitida a humanos e outros mamíferos pelo contato com fezes ou urina de triatomíneos, conhecidos como barbeiros (OMS, 2022). Duas espécies de triatomíneos, dentre uma centena, foram predominantemente responsáveis pela transmissão intradomiciliar em humanos: *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, na América do Sul e na América Central, respectivamente. Estas condições de transmissão estão presentes da latitude 42°N até latitude 40°S, o que significa que a doença de Chagas ocorre desde o sul dos Estados Unidos da América até o sul da Argentina. (Moreno, 2017).

A incidência anual é 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 (Ministério da Saúde, 2022).

Em 2006, o Brasil recebeu o Certificado Internacional de Interrupção Vetorial e por Hemotransusão da Doença de Chagas, graças a programas de controle de transmissão bem sucedidos na década de 1980 envolvendo o combate ao vetor, a melhoria das condições habitacionais e o controle sorológico nos bancos de sangue, resultaram em diminuição significativa da transmissão vetorial, no campo, e da transfusional, nas cidades. No entanto, outros modos de transmissão ainda apresentam riscos como: transfusão sanguínea; transmissão congênita/vertical; via oral, pela ingestão acidental de alimentos contaminados por triatomíneos infectados ou pela suas excretas; acidente ocupacional/laboratorial; manipulação e consumo de carne de caça; e transplante de órgãos. Outros mecanismos de transmissão hipoteticamente viáveis, na condição de alta parasitemia no indivíduo infectado, incluem: a via sexual; o aleitamento materno; a participação de outros tipos de artrópodes e, ainda, compartilhamento de agulhas e seringas no consumo de droga injetáveis (Ferreira, 2017). Atualmente, no Brasil, a principal forma de transmissão da doença é via oral, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Distribuição de casos de doença de Chagas aguda, segundo provável forma de transmissão. Brasil, 2021.



Fonte: Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. Ministério da Saúde, 2021.

O Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde em 2021, a maior incidência de infecções da doença na fase aguda é na região norte, com destaque para o estado do Pará que corresponde a 88,36% das infecções do Brasil, como mostra a tabela 1. O boletim mostra também que 85% dos casos registrados de infecções no Brasil em 2020 correspondem a pessoas pardas, sendo a faixa etária média de 33,8 anos.

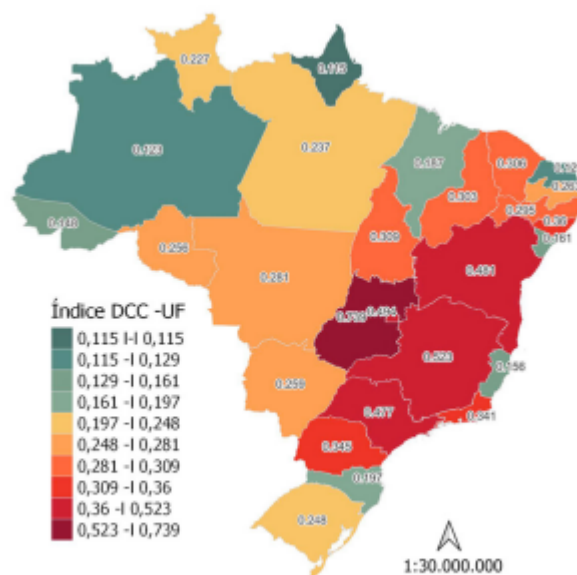
Tabela 1. Número de casos de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidades Federadas de infecção. Brasil, 2021.

Região/Unidade Federada	Número de infecções	%
Rondônia	1	0,68
Acre	4	0,68
Amazonas	5	3,42
Roraima	0	0
Pará	129	88,36
Amapá	2	1,37
Tocantins	0	0
Norte	138	95
Maranhão	0	0
Piauí	0	0
Ceará	0	0
Rio Grande do Norte	0	0
Paraíba	0	0
Pernambuco	0	0
Alagoas	0	0
Sergipe	0	0
Bahia	3	2,05
Nordeste	3	2,05
Minas Gerais	1	0,68
Espírito Santo	0	0
Rio de Janeiro	3	2,05
São Paulo	0	0
Sudeste	4	2,74
Paraná	1	0,68
Santa Catarina	0	0
Rio Grande do Sul	0	0
Sul	1	0,68
Mato Grosso do Sul	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0
Goiás	0	0
Distrito Federal	0	0
Centro-Oeste	0	0
Brasil	146	100,00

Fonte: Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. Ministério da Saúde, 2021.

No entanto, o índice de vulnerabilidade por Doença de Chagas na fase crônica (Figura 2), mostra que as regiões pouco afetadas pelos casos de infecção pela fase aguda da doença, como a região sudeste e a centro-oeste, são mais comprometidas que a região norte. Isso se deve principalmente pela melhoria das condições sociais nos espaços rurais dessas regiões, que diminuíram o contato da população com os vetores, por isso casos crônicos da doença são mais comuns, pois correspondem a infecções antigas.

Figura 2. Distribuição do índice de vulnerabilidade para DCC, por UF e DF.



Fonte: Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. Ministério da Saúde, 2022.

Como mencionado, a Doença de Chagas pode se desenvolver, principalmente, de duas formas diferentes. A fase aguda da doença é aquela que se manifesta localmente logo após a infecção, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva, membrana mucosa que protege a pálpebra, ou na pele. Estas lesões aparecem em 50% dos casos agudos dentro de 4-10 dias após a picada do barbeiro, regredindo em um ou dois meses. As manifestações mais comuns são: febre, inchaço local e generalizado, aumento do baço e do fígado e distúrbios cardíacos. Complicações por meningoencefalite são mais comuns na primeira infância, levando à morte em 10% dos casos (Neves, 2005).

Por outro lado, a fase crônica pode ser assintomática, manifestando-se em sobreviventes da fase aguda depois de um longo período com a doença latente sem sintomas, ainda que apresentem exames sorológicos positivos. Após esse período a fase crônica pode se manifestar de maneira sintomática sob duas formas: a cardíaca, cuja principal característica é

a insuficiência cardíaca congestiva devido ao enfraquecimento muscular, e a digestiva, que é caracterizada por lesão dos plexos nervosos intramurais, repercutindo na função motora, principalmente do esôfago e do cólon (Neves, 2005).

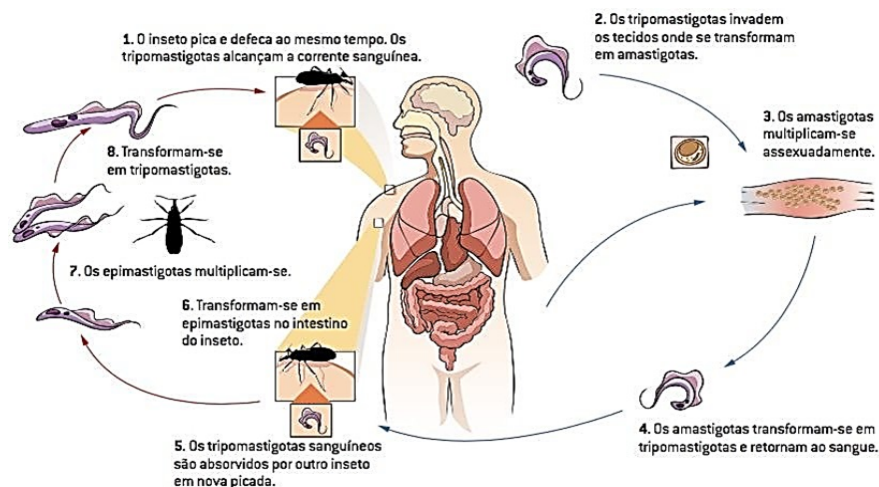
A Doença de Chagas (DDC) voltou a entrar em foco nos últimos dois anos devido a pandemia que COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, que atingiu o Brasil no início de 2020, resultando na morte de 685.428 mil brasileiros até o dia 19 de setembro de 2022, o que implica em uma taxa de mortalidade de 326,2 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2022). Além disso, a pandemia causou um cenário caótico na saúde pública e economia do país. Neste contexto, a Doença de Chagas foi considerada agravante para a COVID, devido a complicações cardiovasculares que podem ocorrer em portadores da doença, especialmente na fase crônica (Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2020). Mais do que nunca se faz necessária a busca de fármacos eficazes para DDC, não apenas na fase aguda, mas também na fase crônica.

1.1.2 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico do parasita *T. cruzi* possui vários estágios evolutivos conforme descrito na Figura 3. A forma tripomastigota é alongada (podendo se apresentar como formas finas e largas), com cinetoplasto com formato arredondado localizado na região posterior ao núcleo, flagelo emergindo da bolsa flagelar. Esta forma é altamente infectante, e pode ser encontrada no inseto vetor (porção posterior do intestino, no reto); sangue e espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados; culturas de células infectadas; cultivo axênico (Castro, 2017).

A forma amastigota é arredondada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão na região anterior ao núcleo, flagelo curto que emerge da bolsa flagelar. Pode ser encontrada no interior de células em hospedeiros infectados, bem como em cultivo axênico. Já a forma epimastigota é alongada, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, e percorre aderido a parte do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior. Pode ser encontrado no tubo digestivo do inseto vetor; cultivo axênico (Castro, 2017).

Figura 3. Estágios evolutivos do parasita *T. cruzi*.



Fonte: CMQV (<https://cmqv.org/dicas/doenca-de-chagas/>)

O mecanismo de infecção por *T. cruzi* é caracterizado pela penetração de tripomastigotas eliminados na excreção do vetor durante o repasto sanguíneo e interação com as células da pele do hospedeiro. Só então ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples. A seguir, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício. Estes tripomastigotas caem na corrente circulatória, atingem outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro (Neves, 2005).

1.1.3 Benzonidazol

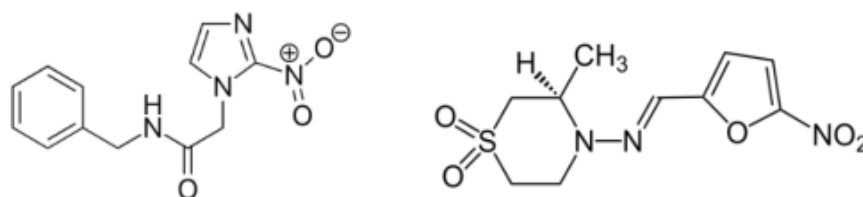
O benzonidazol (Figura 4) é o fármaco recomendado para o tratamento da doença de chagas pelo Ministério da Saúde no Brasil, seu uso é indicado na fase aguda, logo após a infecção. A eficácia do remédio diminui com o tempo de infecção. São relatados efeitos colaterais, especialmente em adultos, o que levou ao abandono do tratamento em muitas situações (Moreno, 2017). Como alternativa, é recomendado pelo Ministério da Saúde o nifurtimox (Figura 4) caso haja intolerância ou falta de resposta ao benzonidazol.

A dose recomendada do uso do benzonidazol para adultos é de 5 mg/kg/dia, e para crianças 5-10 mg/kg/dia, ambas por via oral, durante 60 dias. O medicamento pode ser obtido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e é contraindicado para gestantes ou mulheres em idade fértil e que não estejam em uso de contraceptivos (Ferreira *et al*, 2019). São relatadas na literatura os seguintes efeitos colaterais ao benzonidazol: erupção cutânea, dermatite alérgica,

distúrbios gastrointestinais, anemia, fadiga, taquicardia, cefaleia, vertigem, insônia, mialgia, entre outras (Gontijo, 2018).

Tendo em vista os efeitos colaterais relatados e a diminuição da eficácia do fármaco a longo prazo, o que dificulta o tratamento de pacientes na fase crônica da doença, é urgente que sejam direcionados esforços na pesquisa de substâncias com atividade antiparasitária alta e baixa citotoxicidade, que possam vir a se tornar possíveis substitutos do benzonidazol.

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



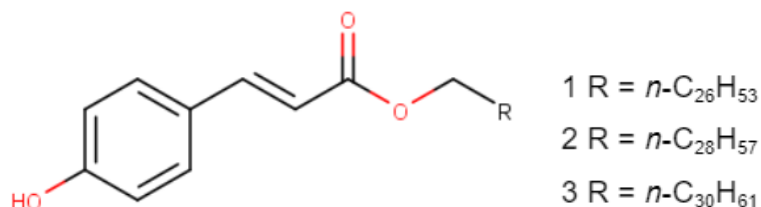
Estudos de produtos naturais como fonte de obtenção de compostos com atividade antiparasitária têm sido descritos na literatura e surgem como alternativas promissoras. Plantas do gênero *Baccharis*, facilmente encontradas no Brasil, têm recebido atenção devido ao perfil fitoquímico e farmacológico, em especial pela produção e acúmulo de metabólitos com ação anti-Trypanossoma (Ueno, 2017; Silva, *et al* 2021; Silva, *et al* 2022).

1.2 Gênero *Baccharis* e o potencial farmacológico

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae, que inclui mais de 500 espécies distribuídas pelo continente americano, desde os Estados Unidos até a Argentina, sendo que 90% encontram-se na América do Sul. As plantas pertencentes a este gênero normalmente são arbustos perenes de 50 cm a 4 m de altura. A grande concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que toda essa área é o provável centro de origem do táxon. (Budel, *et al*. 2005). O perfil fitoquímico das espécies do gênero *Baccharis* desperta interesse devido ao uso popular destas plantas para tratamento de doenças, especialmente sob a forma de infusões (Ueno, 2017). Estudos anteriores confirmam a presença de compostos com atividade antiparasitária nestas espécies, algumas dessas substâncias de interesse são flavonóides presentes na *B. uncinella* e *B. retusa*, triterpenos presentes na *B. uncinella* e diterpenos da *B. lateralis* e *B. retusa* (Silva *et al*, 2021). Em algumas espécies de *Baccharis* é relatado a presença de p-cumaratos de alquila, como por exemplo a *B. dracunculifolia*, planta amplamente utilizada na medicina caseira (Rinhel *et al*, 2013), também na *B. ligustrina*, com destaque para p-cumarato de *n*-hexacosila, de *n*-octacosila e de *n*-triacontila (Figura 5) que

apresentaram baixa citotoxicidade ($>200 \mu\text{M}$ para células do tipo NCTC) e atividades anti-trypanossoma significativas (Silva *et al*, 2022).

Figura 5. Estrutura dos p-cumaratos de p-cumarato de *n*-hexacosila, de *n*-octacosila e de *n*-triacontila isolados da *B. ligustrina*



A *Baccharis mattogrossensis* (Figura 6), também chamada de *Baccharis quitensis*, é uma planta nativa do Brasil nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, também é encontrada do nordeste da Argentina, Bolívia, Equador e Peru. Até o presente momento, o estudo do perfil fitoquímico da *B. mattogrossensis* é inédito, ainda que existam registros botânicos datados de 1818.

Figura 6. Exemplar de *B. mattogrossensis*.



Fonte: Royal Botanic Garden, Plants of The World Online

(<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:183661-1>).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar compostos bioativos *Baccharis matogrossensis*, cujo estudo fitoquímico é inédito na literatura, e testar a atividade antiparasitária do composto em questão frente às formas amastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Fracionamento do extrato hexânico das partes aéreas da *B. matogrossensis* por meio de técnicas cromatográficas;
- Caracterização estrutural do composto de interesse por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray;
- Avaliação da atividade antiparasitária (*T. cruzi*) do composto isolado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Solventes

Para os processos de extrações, eluições cromatográficas de colunas e placas foram utilizados solventes das marcas Casa Americana® (MeOH, 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.

3.1.2 Cromatografia

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

3.1.3 Material vegetal

Os exemplares de *B. matogrossensis* foram coletados por Guilherme de Medeiros Antar (IB-USP) na cidade de Campos do Jordão - SP em dezembro/2021. O material foi processado em uma exsicata do material identificado, que foi depositada no herbário do IB-USP sob código de Antar-023.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração

As partes aéreas de *Baccharis mattogrossensis* foram secas em estufa a 40 °C por 48 horas com ventilação para, em seguida, serem moídas em moinho de facas (modelo RI2094/01/A, 110-220V ~60 Hz, 600-750W). Deste processo foram obtidos 36 g de material seco, que foram extraídos sucessivas vezes com n-Hexano, que foi evaporado em um evaporador rotativo Büchi, modelo R-215, munido de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710. Ao final deste processo foram obtidos 865,1 mg de extrato bruto.

3.2.2 Fracionamento cromatográfico

O extrato hexânico foi submetido a cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de entender o comportamento da amostra em diferentes sistemas de eluição.

A partir disso, 400 mg do extrato hexânico foi submetido a fracionamento por meio de coluna aberta (3 cm de diâmetro por 60 cm de altura), utilizando como fase estacionária 270 g de sílica gel. Como fase móvel foram utilizadas misturas de Hexano:AcOEt em diferentes proporções, partindo de hexano a 100%, seguindo com 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 2:8 e 100% de AcOEt e por fim com 100% de MeOH. O fracionamento resultou em 147 frascos que foram submetidos à CCD para avaliação. Após a revelação das placas com solução de sulfato cérico e luz UV, as frações foram reunidas conforme a similaridade do comportamento nas placas. Sendo assim, foram obtidos 16 grupos como apresentado abaixo na Tabela 2.

Tabela 2. Grupos formados após o fracionamento do EHBM.

Subgrupos	Frações	Massa (mg)
EHBM 1	Vm 1 e 2, 1 e 2	33,4
EHBM 2	3-18	25,3
EHBM 4	19-37	15,0
EHBM 5	38	31,3
EHBM 6	39-52	16,3
EHBM 7	53-55	45,0
EHBM 8	56-66	37,1
EHBM 9	67-81	11,6
EHBM 10	82-87	19,4
EHBM 11	88-91	21,6
EHBM 12	92-106	29,00
EHBM 13	107-112	17,7
EHBM 14	113-122	24,8
EHBM 15	123-133	25,7
EHBM 16	134-143, Vm AcOEt, Vm MeOH	43,5

Todas as frações foram submetidas a RMN de ^1H , aquelas com sinais que se diferenciavam do sinal típico de material graxo foram submetidas a análise por RMN de ^{13}C . Foi identificado no subgrupo EHBM 7 sinais característicos de *p*-cumaratos de alquila, substância de interesse no trato de doenças parasitárias. Desta forma, esse grupo foi selecionado para estudos posteriores para a determinação de atividade antiparasitária, em especial frente ao *T. cruzi*.

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.

3.2.3 Determinação da atividade antiparasitária

Os animais experimentais foram obtidos no criadouro de animais do Instituto Adolfo Lutz - Estado de São Paulo, Brasil. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para a

obtenção de macrófagos (peritoneais) - experimentos intracelulares e camundongos BALB/c machos para manutenção do *T. cruzi*. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em caixas esterilizadas em ambiente controlado. O projeto foi conduzido com aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa (projeto CEUA-IAL 05/2018), de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals da National Academy of Sciences*. Células NCTC (clone 929, ATCC) e LLC-MK2 (ATCC CCL 7) foram mantidas em RPMI-1640 mais 10% de FBS a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas com meio RPMI-1640 suplementado com FBS a 10%. Os macrófagos foram mantidos por 24h a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidos em células LLC-MK2, utilizando meio RPMI-1640 mais FBS 2% a 37°C em incubadora umidificada com 5% CO₂. Valores de CE₅₀ (concentração efetiva de 50%) do composto isolado contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram determinados em macrófagos infectados. Os macrófagos, obtidos como descrito anteriormente, foram plaqueados em uma lâmina de câmara de 16 poços (placa NUNC, ThermoFisher; 1 x 10⁵/poço) e incubados por 24 h a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Tripomastigotas obtidos de LLC-MK2 previamente infectados, foram lavados em meio RPMI-1640, contados e utilizados para infectar as células (1 x 10⁶/poço). Após 2 h de infecção, os tripomastigotas não internalizados foram removidos por lavagem com meio RPMI. Os compostos foram então incubados com macrófagos infectados (48h a 37°C, 5% CO₂) em diferentes concentrações de diluições em série (30,00 – 1,87µM) usando benzonidazol como droga padrão. Ao final do ensaio, as lâminas foram fixadas com MeOH e coradas com Giemsa antes da contagem em microscópio de luz (EVOS M5000, Thermo).

O composto isolado da *B. matogrossensis* foi dissolvido em DMSO, diluído em meio de cultura, em concentrações seriadas (150 - 1,5µM) e incubado com as formas tripomastigotas para se determinar as respectivas CE₅₀. Os ensaios foram realizados em meio RPMI-1640 em placas de 96 poços e, em seguida, formas tripomastigotas do parasita foram adicionadas na concentração de 1 × 10⁶ parasitas/poço. As placas foram mantidas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 h. Após esse período, foram adicionados 20 µL de resazurina a 10% e as placas foram incubadas por mais 20h nas mesmas condições para se determinar a viabilidade dos parasitas. 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. Como controle positivo (100% de

células mortas), foi utilizado o fármaco padrão benzonidazol e, como controle negativo, foram utilizadas células não-tratadas.

3.2.4 Determinação da citotoxicidade

O valor de CC_{50} (concentração citotóxica de 50%) do composto isolado foi realizado para células NCTC (clone L929). As células foram semeadas a uma concentração de 6×10^4 células/poço - placas de 96 poços (Thermo Fisher) e incubadas com diluições seriadas do composto (200 – 1,56 μ M) por 48h a 37°C em uma incubadora de 5% CO_2 . Os valores de CC_{50} foram determinados pelo ensaio MTT. A densidade óptica foi determinada em FilterMax F5 (Molecular Devices) a 570 nm.

Os valores do índice de seletividade (IS) foram calculados pela razão: CC_{50} contra células NCTC/ CE_{50} contra amastigotas intracelulares. A determinação dos valores de CC_{50} e CE_{50} foi obtida a partir do software Pad Prism 5.0 das curvas de dose-resposta sigmóide.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação estrutural do *p*-cumarato

O composto obtido por fracionamento do extrato hexânico da *Baccharis mattoirosensis* foi submetido a RMN de 1H e ^{13}C , os resultados estão descritos na Tabela 3. comparado com a literatura, Os dupletos observados em δ 7,43 e 6,83 com $J= 8,6$ Hz são característicos de hidrogênios em sistemas aromáticos *p*-dissubstituídos. Os dupletos observados δ 7,61 e 6,30 ($J= 15,9$ Hz) indicam a configuração *E* de hidrogênios em um sistema α , β - insaturado. O tripleto em δ 4,17 ($J=6,7$ Hz) corresponde ao hidrogênio carbinólico. Além disso, um singlete intenso em δ 1,2 associado a um tripleto deformado em δ 0,84 ($J= 6,5$ Hz) sugere a presença de hidrogênios alquílica longa.

O RMN de ^{13}C exibiu sinais do anel aromático em δ 116,4 e 130,48, correspondentes a C-2/C-5, C-3/C-6, δ 127,9 correspondente a C-1 e δ 158,08, a C-4. Além destes, foram observados os sinais referentes ao carbono carboxílico em δ 168,02 e do carbono carbinólico em δ 65,19. Os carbonos metilênicos da cadeia alquílica longa são observados entre δ 29,9 e 30,2, além do grupo metílico terminal em δ 14,7.

Desta forma, a comparação dos dados obtidos com aqueles descritos na literatura para *p*-cumaratos de alquila previamente isolados de *B. retusa* permite definir a estrutura parcial da substância isolada como mostrada na Figura 7.

Tabela 3 - Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto isolado comparados com dados espectrais de *p*-cumaratos de alquila.

<i>(E)</i> - <i>p</i> -cumarato de alquila						
Posição	$\delta\text{H exp (Multip./J em Hz)}$	$\delta\text{H lit.*}$	$\delta\text{H lit.**}$	$\delta\text{C exp.}$	$\delta\text{C lit.*}$	$\delta\text{C lit.**}$
1	-	-	-	127,9	127,3	127,4
2	7,43 (d; 8,6)	7,45 (d; 8,3)	7,45 (d; 8,7)	130,4	129,9	132,3
3	6,83 (d; 8,6)	6,84 (d; 8,3)	6,83 (d; 8,7)	116,4	115,9	115
4	-	-	-	158,1	157,7	156,7
5	6,83 (d; 8,6)	6,84 (d; 8,3)	6,83 (d; 8,7)	116,4	115,9	115
6	7,43 (d; 8,6)	7,45 (d; 8,3)	7,45 (d; 8,7)	130,4	129,9	132,3
7	7,61 (d; 15,9)	7,61 (d; 15,8)	7,61 (d; 15,8)	144,7	144,3	143,4
8	6,30 (d; 15,9)	6,63 (d; 15,8)	6,32 (d; 15,8)	116,4	115,8	115,9
9	-	-	-	168	167,7	166,8
- OCH ₂ -	4,17 (t; 6,7)	4,21 (t; 6,7)	-	65,2	64,4	-
-(CH ₂) _n -	1,2 (s)	1,8 (s)	1,2 (s)	29,9 - 30,2	28,7-29,6	29,3-29,7
-CH ₃	0,84 (t; 6,5)	0,87 (t; 6,6)	0,88 (t; 6,6)	14,7	14,2	14,13

* Júnior, *et al*, 2014 / ** Ueno, 2018.

Figura 7 - Estrutura do *(E)*-*p*-cumarato de alquila.

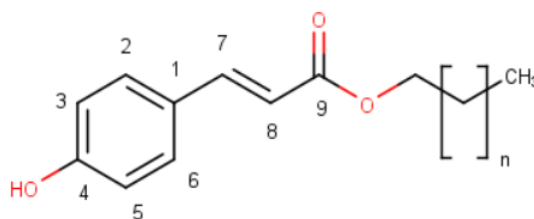


Figura 8 - Espectro de RMN (δ / ppm, 300 MHz, CDCl_3) de ^1H da fração EHBM 7.

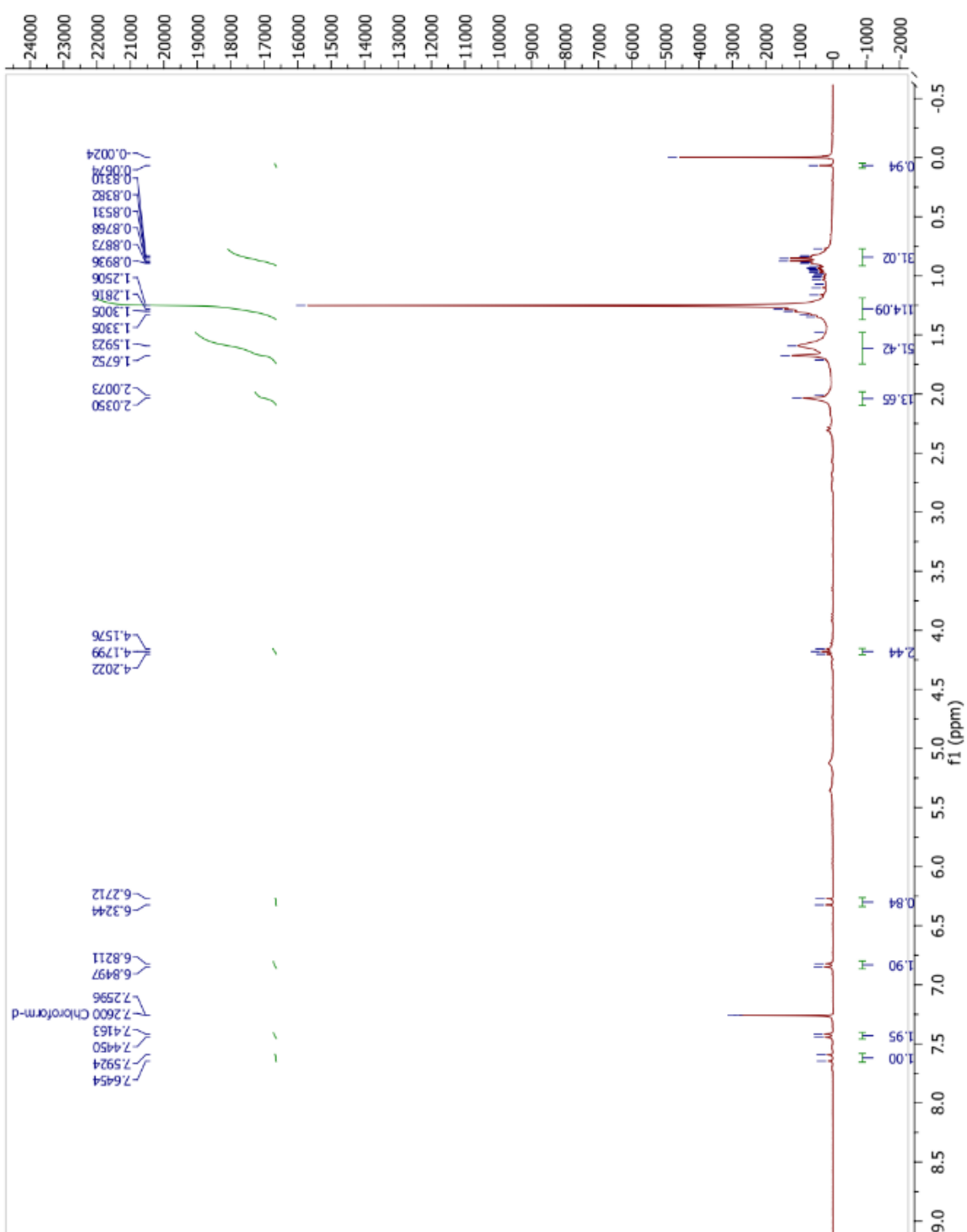
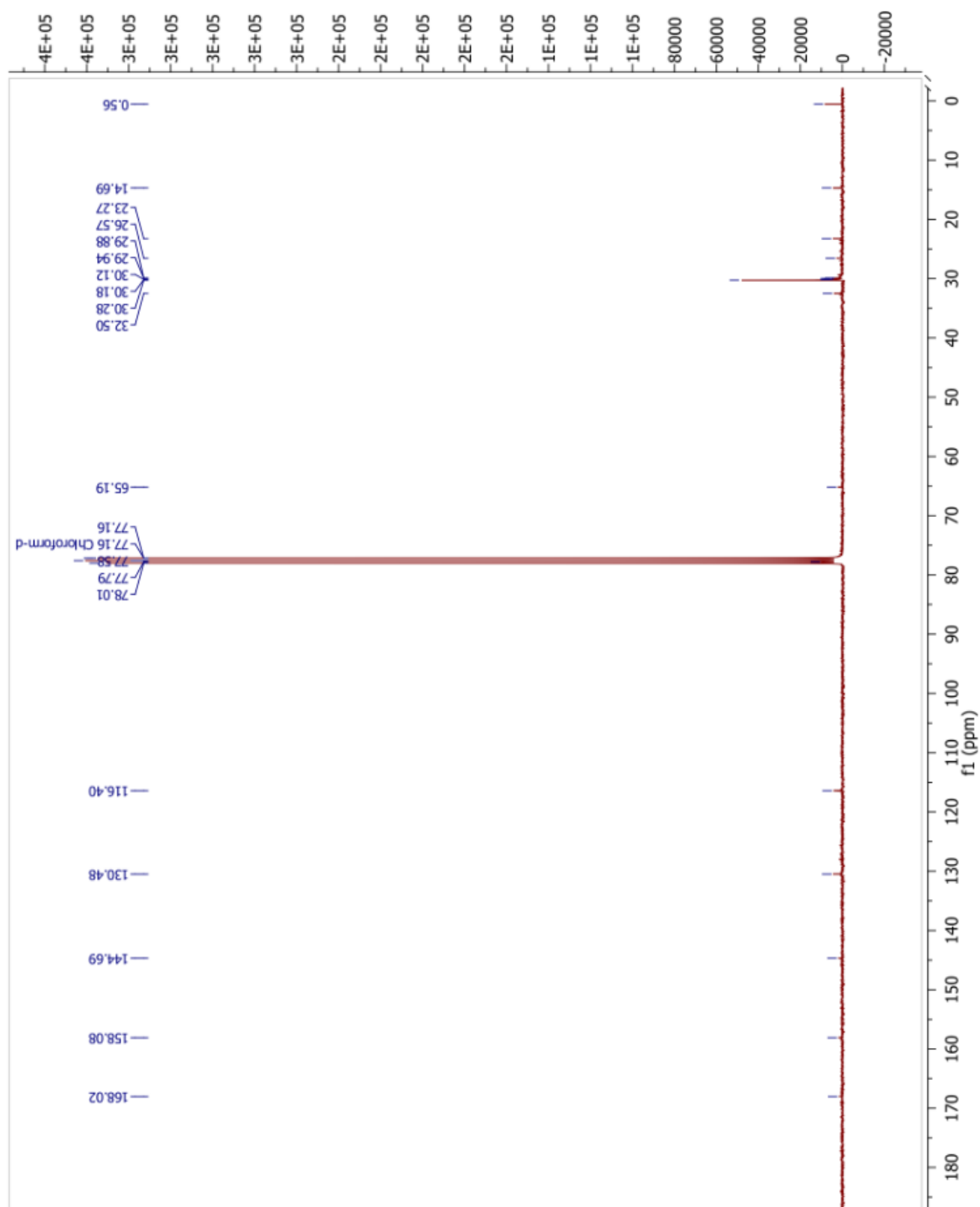


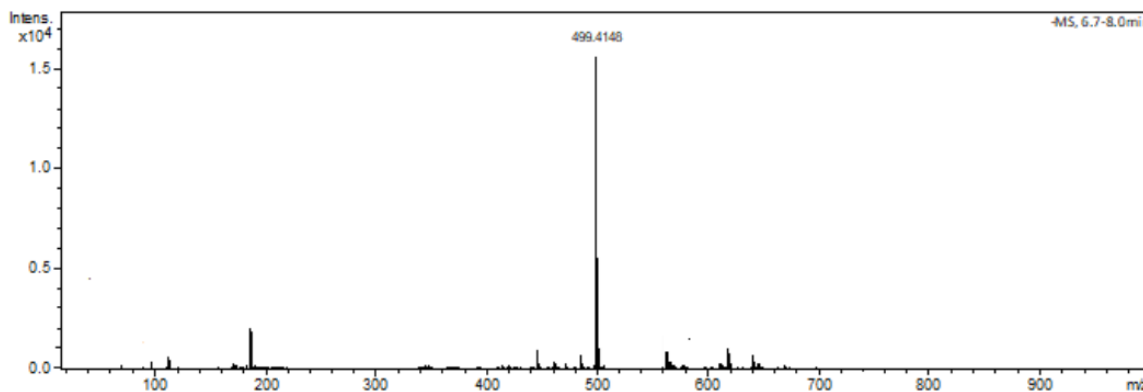
Figura 9 - Espectro de RMN (δ / ppm, 75 MHz, CDCl_3) de ^{13}C da fração EHBM 7.



Com o objetivo de definir a extensão da cadeia alquílica, foi obtido o espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (ESI - modo negativo) mostrado na Figura 10, onde foi observado m/z 499,4148 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{O}_3$.

(499,4151). Dessa forma, é possível concluir que a fórmula molecular da substância é $C_{33}H_{56}O_3$ e, portanto, a cadeia lateral é composta por 24 átomos de carbono.

Figura 10. Espectro de massas de alta resolução (ESI - modo negativo) da fração 7 de EHBM.



A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que o composto isolado consiste no (*E*)-3-(4-hidroxi fenil)prop-2-enoato de tetracosila, usualmente chamado de (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila, isolado anteriormente na planta *Dendrobium falconeri*, espécie de orquídea nativa da ásia (Sritularak e Likhitwitayawuid, 2009), e nas raízes da planta egípcia *Lotus polyphyllus* (Abdel-Kader, *et al* 2006).

4.2 Avaliação da atividade antiparasitária

O composto (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila é ativo frente ao *T. cruzi* como mostra a Tabela 4. O teste *in vitro* mostrou o valor de $17,8 \pm 4,2 \mu\text{M}$, enquanto seriam necessários mais de 200 μM para que o composto fosse tóxico à célula do hospedeiro. Isso confere ao composto isolado o índice de seletividade de 11,2 para a forma tripomastigota, que é maior que o IS de 10,7 do benzonidazol. Por outro lado, os resultados para a forma amastigota indicam CE_{50} de $14,5 \pm 4,4 \mu\text{M}$ e CC_{50} maior que 200 μM , o que implica em IS de 13,79, menor que o IS do benzonidazol para amastigotas.

Tabela 4. Efeito antiparasitário do composto isolado (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila 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>E</i>)- <i>p</i> -cumarato de tetracosila	17,8 ± 4,2	14,5 ± 4,4	>200	>11,2	>13,7
Benzonidazol*	18,7 ± 4,1	5,5 ± 0,2	>200	>10,7	>36,3

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

Estudos anteriores mostram que derivados alquílicos de ácido *p*-cumárico, como o (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila, tem atividade antiparasitária expressiva. Os *p*-cumaratos isolados *B. ligustrina* mostram atividade antiparasitária crescente de acordo com o aumento da cadeia lateral (Silva, et al 2022, no prelo). É importante destacar que o ácido *p*-cumárico não apresenta atividade biológica (Tabela 5), o que sugere que a cadeia alquílica é fundamental para penetração do composto na forma intracelular do parasita, uma vez que a membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica, assim o transporte é facilitado por afinidade com a cadeia longa apolar (Pignatello, 2013).

Figura 11. Estruturas de derivados alquílicos do ácido *p*-cumárico.

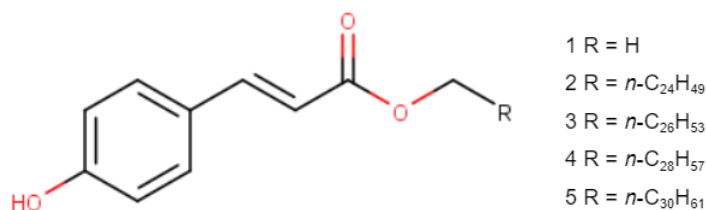
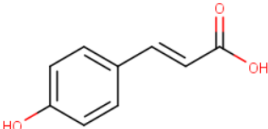
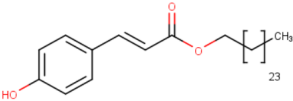
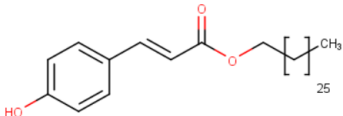
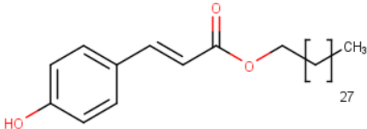
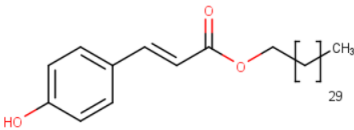


Tabela 5. Comparação entre atividade antiparasitária de derivados alquílicos do ácido *p*-cumárico.

Estrutura	Composto	CE ₅₀ / μM (95% IC) <i>T. cruzi</i> amastigota	CC ₅₀ / μM (95% IC) NCTC	IS amastigota
1*		-	>200	NA
2		14,5 ± 4,4	>200	>13,8
3*		15,7 ± 4,3	>200	>12,7
4*		9,3 ± 1,5	>200	>21,5
5*		6,5 ± 2,1	>200	>30,8

*Fonte: Silva, *et al* 2022.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O composto (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila foi isolado a partir do extrato hexânico das folhas de *B. matogrossensis*, caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética e espectroscopia de massas de alta resolução, cuja estrutura foi confirmada através da comparação com dados da literatura. O composto isolado foi avaliado quanto ao seu potencial contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, na qual foi identificada atividade biológica contra as formas tripomastigota e amastigota do parasita, este estudo é

inédito na literatura. A atividade antiparasitária e baixa toxicidade tornam o (*E*)-*p*-cumarato de tetracosila um composto promissor no estudo de protótipos para o tratamento de Doença de Chagas. Este trabalho colabora ainda com estudos a respeito da atividade biológica de *p*-cumaratos de alquila, que buscam compreender a potencialidade destes compostos como terapia alternativa para doenças tropicais negligenciadas. As perspectivas futuras são de realizar os testes *in vivo* e, caso a eficácia seja comprovada, prosseguir com o estudo sobre métodos eficientes de extração ou síntese do composto, considerando a disponibilidade da planta, o custo e o rendimento dos processos. Estes resultados serão determinantes para o desenvolvimento de um protótipo de fármaco para Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected Tropical Diseases - Overview**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_>. Acesso em: 30 jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease (also known as American trypanosomiasis)**. 13 abr. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_>. Acesso em: 30 jun. 2022.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ DA, RIVERO-ZAMBRANO L, MARTÍNEZ-JUÁREZ LA, GARCÍA-RODRÍGUEZ-ARANA R. **Overcoming the global burden of neglected tropical diseases**. Ther Adv Infect Dis. 19 de out. 2020 ; n 7; doi: 10.1177/2049936120966449. Acesso em: 14 jul 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica**. Boletim epidemiológico. Número especial, abr. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022>>. Acesso em: 14 jul 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas: Dia Mundial**. Boletim epidemiológico. Número especial, 14 abr. 2021. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf

>. Acesso em: 14 jul 2022.

BUDEL, J.M. *et al.* **O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Set 2005. n 15 (3). <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000300018>. Acesso em: 18 jul 2022.

SILVA, M. L. *et al.* **Chemical Constituents from Aerial Parts of *Baccharis sphenophylla* and Effects against Intracellular Forms of *Trypanosoma cruzi*.** Chemistry & Biodiversity. Vol 18, 10. Out 2021. doi.org/10.1002/cbdv.202100466. Acesso em: 18 jul 2022.

JUNIOR, A. R. C; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. **Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (*Myrtaceae*),** Química Nova, Vol. 37, 3, 477-482, 2014.

PUBCHEM . Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; Compound Summary for CID 42642801, **4-Hydroxy-trans-cinnamic acid tetracosyl ester.** 2004. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxy-trans-cinnamic-acid-tetracosyl-ester>> Acesso em: 21 jul 2022.

ROSE, H. S; GOLAN D. E. **Farmacodinâmica.** Anestesiologia - UFSC. 2015. Disponível em: <<https://anestesiologia.paginas.ufsc.br/files/2015/02/Farmacodinamica-texto.pdf>> . Acesso em: 28 ago 2022.

MORENO, A. M. H. **Mecanismos de transmissão da doença de Chagas.** Laboratório de Pesquisa Clínica em doenças de Chagas, Fiocruz. 02 jul 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/doenca/transmissao/#:~:text=O%20Brasil%2C%20em%202006%2C%20recebeu,mecanismos%20de%20transmiss%C3%A3o%20se%20modificaram>>. Acesso em: 02 set 2022.

FERREIRA, R. R; ARAÚJO-JORGE, T. C. **Perguntas e respostas sobre COVID-19 e Doença de Chagas.** Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 24 mar. 2020. Disponível em:

<<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/iciict/41141/Coronav%20e%20doen%20a%20de%20Chagas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso: 02 set 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel Coronavírus Brasil**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 19 set 2022.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, OMS. Histórico da Pandemia de COVID-19. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso 19 set. 2022.

SANCHEZ-LERMEN, R. L. *et al.* **Sintomas do trato digestivo superior e distúrbios motores do esôfago em pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas crônica**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 40, 2. Abr 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200010>>. Acesso em: 20 set 2022.

GONTIJO, M. K. C. L. **Caracterização de reações adversas ao benznidazol em pacientes com doença de chagas no Distrito Federal, Brasil**. Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília, 2018. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia. Disponível em: <https://bdm.unb.br/bitstream/10483/23506/1/2018_MariaKatarineCostaLucasGontijo_tcc.pdf>. Acesso em: 21 set 2022.

FERREIRA, A. M. *et al.* **Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados**. Cadernos Saúde Coletiva. Vol 27, 3, jul-set de 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1414-462X201900030456>>. Acesso em: 28 set 2022.

CASTRO, S. L; SOEIRO M. N. C. **Drogas tripanossomicidas - Estudos pré-clínicos da doença de Chagas**. Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 02 jul 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>>. Acesso em: 28 set 2022.

Biblioteca Virtual em Saúde, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/doenca-de-chagas-10/>>. Acesso: 29 set 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease - fact sheet (portuguese)**. Disponível

em:<[https://www.who.int/docs/default-source/documents/chagas-disease-fact-sheet-\(portuguese-pdf\).pdf?sfvrsn=64375240_4#:~:text=Para%20matar%20o%20parasita%2C%20a,os%20casos%20de%20transmiss%C3%A3o%20cong%C3%AAnita](https://www.who.int/docs/default-source/documents/chagas-disease-fact-sheet-(portuguese-pdf).pdf?sfvrsn=64375240_4#:~:text=Para%20matar%20o%20parasita%2C%20a,os%20casos%20de%20transmiss%C3%A3o%20cong%C3%AAnita)>. Acesso em: 29 set 2022.

CUNHA-FILHO MSS, SÁ-BARRETO LCL, LEONARDI D, LAMAS MC, SALOMÓN CJ. **Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas**. Brasília Med 2012;Vol. 49, 4: p. 279-283. Disponível em: <<https://rbm.org.br/details/126/pt-BR/recentes-avancos-no-tratamento-da-doenca-de-chagas>>. Acesso em: 2 out 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. **COVID-19 e Chagas: pessoas que vivem com a doença correm risco de complicações graves**. 11 jun 2020. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/covid-19-e-chagas-pessoas-que-vivem-com-doenca-correm-risco-de-complicacoes-graves/>>. Acesso em: 2 de out 2022.

COSTA-SILVA T. A. *et al.* **Ent-kaurane diterpenes isolated from n-hexane extract of *Baccharis spheophylla* by bioactivity-guided fractionation target the acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi***. Phytomedicine, Vol. 93, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153748>.

SILVA, M. L. *et al.* **Fenilpropanoides com ação anti-trypanosoma cruzi isolados de *Baccharis ligustrina* c. dc. (ASTERACEAE)**. Química Nova (no prelo). DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170953>.

ROYAL BOTANIC GARDEN. ***Baccharis quitensis***. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:183661-1>>. Acesso em: 10 out 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Núcleo de ensino, pesquisa e extensão. **Transporte através da membrana.** Disponível em: <http://www.nuepe.ufpr.br/portal/?page_id=6581>. Acesso em: 10 out 2022.

UENO, A. K. **Constituintes químicos das partes aéreas de *Baccharis retusa* (ASTERACEAE) – identificação e avaliação de atividade biológica.** Orientador: Professo Dr. João Henrique Ghilardi Lago. 2017. Dissertação (mestrado) – Curso: Mestre em Ciência da Tecnologia e Sustentabilidade *Strictu Sensu*. 122 f. Instituto De Ciências Ambientais Químicas E Farmacêuticas. Universidade Federal De São Paulo.

SILVA, M. L. **Avaliação de atividade antiparasitária de uma neolignana isolada das folhas de *Saururus cernuus* L. (Saururaceae).** Orientador: Professor Dr. João Henrique Ghilardi Lago. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química. Centro de Ciências Naturais E Humanas. Universidade Federal do ABC.

SILVERSTEIN, Robert M. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** São Paulo: Grupo GEN, 2019. E-book. ISBN 9788521636472. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521636472/>>. Acesso em: 17 out. 2022.

PIGNATELLO, R. Pignatello. 1 - Biological membranes and their role in physio-pathological conditions. *In: Woodhead Publishing Series in Biomedicine; Drug-Biomembrane Interaction Studies*, Woodhead Publishing, 2013, p. 1-46, Disponível em: <<https://doi.org/10.1533/9781908818348.1>>. Acesso em: 18 out. 2022.

CHATELAIN, E; IOSET, J. **Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model.** Drug Design, Development and Therapy, 2011, Vol. 5:, 175-181, DOI: 10.2147/DDDT.S16381. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/DDDT.S16381>>. Acesso em: 18 out. 2022.

SUNG, H. *et al.* **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. Mai/Jun, 2021. Vol 71, 3, p 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Disponível em: <<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>> .

Acesso em: 18 out. 2022.

ABDEL-KADER, M. S. *et al.* **Two new isoflavone derivatives from the roots of an Egyptian collection of *Lotus polyphyllus***, Natural Product Research. 2006. Vol. 20, 10, p. 922-926, DOI: 10.1080/14786410500364627. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786410500364627>>. Acesso em: 18 out. 2022.

SRITULARAK, B; LIKHITWITAYAWUID, K. **New Bisbibenzyls from *Dendrobium falconeri***, Helvetica. 2009. Vol. 92, 4, p. 740-744. DOI: <https://doi.org/10.1002/hlca.200800391>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hlca.200800391?casa_token=B3XOeaYsEz8AAAAA:YVcR2kBNGBgLL8ziyw4tzZO_rht3xSCBFzxYvYoXBw3oiuvccpYLuDnqCjoqffqL-R3Vq5ezrPmBLLj3>. Acesso em: 18 out. 2022.