

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Jenifer de Lima Febronio

METABÓLITOS ESPECIAIS DE *Nectandra leucantha* (LAURACEAE) - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.

Santo André
ABRIL - 2021

Jenifer de Lima Febronio

METABÓLITOS ESPECIAIS DE *Nectandra leucantha* (LAURACEAE)- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.

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. João Henrique
Ghilardi Lago

Jenifer de Lima Febronio

João Henrique Ghilardi Lago

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).

Febronio, Jenifer de Lima

METABÓLITOS ESPECIAIS DE *Nectandra leucantha* (LAURACEAE)-
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA / Jenifer de Lima Febronio. — 2021.

37 fls.

Orientador: João Henrique Ghilardi Lago

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,
Bacharelado em Química, Santo André, 2021.

1. Produtos Naturais. 2. *Nectandra leucantha*. 3. *Trypanosoma cruzi*.
I Lago, João Henrique Ghilardi. II. Bacharelado em Química, 2021.
III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Monografia apresentada pela aluna Jenifer de Lima Febrônio, em 14 de Abril de 2021.

Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini

Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. André Sarto Polo

Universidade Federal do ABC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Alguns dos primeiros compostos isolados e derivados de planta.	11
Figura 2 - Flores e Folhas de <i>Nectandra leucantha</i> .	13
Figura 3 - Algumas Etapas Biossintéticas da Formação de Precusores de Lignanas e Neolignanas.	14
Figura 4 - Formação das neolignanas do tipo 3-O-4', isoladas neste trabalho.	15
Figura 5 - Estruturas das neolignanas 1 – 4 isoladas de <i>N. leucantha</i> .	16
Figura 6 - Estruturas das neolignanas 5 e 6 isoladas de <i>N. leucantha</i> .	16
Figura 7 - Distribuição de cadastros autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, Brasil, dez/2015.	17
Figura 8 - Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.	19
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do extrato hexânico dos galhos de <i>N. leucantha</i> .	25
Figura 10 - Estruturas moleculares dos compostos I e II .	26
Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H do composto I (δ , CDCl_3 , 500 MHz).	27
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H do composto II (δ , CDCl_3 , 500 MHz).	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações, agrupamentos e massas após fracionamento do extrato hexânico de <i>N. leucantha</i> .	22
Tabela 2 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H (J/Hz, CDCl ₃ , 500 Hz) para substâncias I e II .	30
Tabela 3 - Atividades antiparasitárias e citotoxicidade dos compostos I e II .	31

SUMÁRIO

RESUMO	9
1. Introdução e Justificativa	10
1.1 A Química dos Produtos Naturais	10
2 Revisão Bibliográfica	11
2.1 <i>Nectandra leucantha</i>	11
2.2 Lignanas e Neolignanas	13
2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	17
3 Objetivos	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 Procedimento	20
4.1 Equipamentos	20
4.2 Solventes e reagentes	21
4.3 Procedimentos Cromatográficos	21
4.4 Coleta do Material Vegetal	21
4.5 Obtenção dos Extratos	22
4.6 Fracionamento e Caracterização Química	22
4.7 Avaliação das Atividades Antiparasitárias <i>in vitro</i>	23
4.7.1 Avaliação da Atividade Tripanossomicida	23
4.7.2 Células de Mamífero NCTC	23
4.7.3 Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀)	23
4.7.4 Avaliação da Citotoxicidade	24
5 Resultados e Discussão	24
5.1 Identificação dos compostos I e II	26
5.2 Avaliação da Atividade Antiparasitária dos Compostos Isolados	30
6 Considerações finais	32
BIBLIOGRAFIA	33

ABSTRACT

The study of natural products has provided material for research for years in organic chemistry, especially for phytochemistry. The knowledge about these special metabolites has the purpose of characterizing the structures, and elucidating the chemical and biological properties, aiming at the discovery of compounds that present pharmacological activity. The plant species *Nectandra leucantha* belongs to the Lauraceae, a family composed of about 2,500 species and found in tropical and subtropical climates. The literature describes the popular use of plants of this family due to the hypotensive, sweat, anti-rheumatic, anti-syphilitic, antispasmodic action, among others. In this context, the present project proposed the isolation of major and minor compounds of hexane extract from the branches of *N. leucantha*, as well as the performance of bioassays to determine antiparasitic action, especially against *Trypanosoma cruzi*. Thus the extract was subjected to chromatographic fractionation, which allowed, so far, the isolation of two substances: dehydrodieugenol B (**I**) and methyl dehydrodieugenol B (**II**). The structures of both compounds were defined by analysis of the NMR spectra followed by comparison with data described in the literature. Finally, compounds I and II were evaluated for their biological activity against *Trypanosoma cruzi* and showed a potential with IC_{50} of 38.6 ± 4.1 and > 100 μ M, respectively, and reduced toxicity against NCTC cells ($CC_{50} > 200$ μ M).

RESUMO

A natureza é uma fonte inesgotável de novas entidades químicas, proporcionando novos esqueletos e compostos com atividades biológicas. Neste contexto, a química de produtos naturais se faz importante na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos materiais, inclusive fármacos. *Nectandra leucantha* é pertencente à família Lauraceae, composta por cerca de 2.500 espécies, muitas das quais a literatura descreve o uso popular com ações como hipotensora, sudorífica, anti-reumática, anti-sifilítica e antiespasmódica. O presente trabalho propôs o isolamento de metabólitos do extrato hexânico dos galhos de *N. leucantha*, assim como a realização de bioensaios para determinação de ação antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, o extrato foi submetido a fracionamento cromatográfico que permitiu o isolamento de duas substâncias: deidrodieugenol B (**I**) e metil deidrodieugenol B (**II**). As estruturas de ambos os compostos foram definidas por análise dos espectros de ressonância magnética nuclear, seguida de comparação com dados descritos na literatura. Finalmente, os compostos **I** e **II** foram avaliados quanto sua atividade frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentando IC₅₀ de 38,6 ± 4,1 e > 200 µM, respectivamente, além de reduzida toxicidade frente às células do tipo NCTC (CC₅₀ > 200 µM).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter cuidado de mim e ter me amparado em todos os momentos.

Agradeço imensamente a minha mãe, Silvia, o que seria de mim sem você, não mediu esforços para me ver na Universidade, deu sangue e suor, me ajudou e me ajuda em tudo que preciso, sua força me inspira.

Agradeço ao meu filho, Rafael Lima Oliveira, minha força para não desistir, a lutar por mais, minha razão de viver, a quem todo meu amor pertence.

Agradeço ao Daniel Oliveira, pai do meu filho e meu melhor amigo, sempre me apoiou em tudo, me ajudou em diversas matérias, chorou comigo e me acalentou, esse trabalho é nosso, pois sem seu apoio ele também não seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago, que entrou na minha vida através de uma matéria de Química Orgânica e me mostrou toda beleza da Química que eu já havia esquecido, sai daquela matéria sabendo que a minha área de pesquisa é produtos naturais, meu eterno agradecimento por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, por ter me orientado de maneira sem igual, e me ensinado tanto!

Agradeço ao Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini, por ter aceitado participar da minha banca e por ter me ensinado sobre os Métodos de Análise em Química Orgânica, técnicas das quais foram necessárias nesse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Sarto Polo por ter feito parte da minha graduação e pela disposição em organizar e compor a banca dos trabalhos de conclusão de curso do Bacharelado em Química.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Anderson, Christine, Deborah, Eric, Fernanda, Geanne, Henrique, Ivanildo, Juliana, Kaio, Marina, Matheus, Thaís e Vinícius, por todo suporte, orientação, ensinamentos, tempo, risadas e companhia, esse trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês!

Agradeço aos meus amigos, que por diversas vezes me apoiaram e incentivaram a não desistir, assim como choraram comigo.

Aos meus familiares, que acreditam na ciência, em especial minha tia Ana Paula, que me mostrou a ciência logo na infância, todo incentivo e experiência que me deixaram fascinada me guiaram até aqui.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do ABC onde pude realizar esse trabalho, bem como ao Instituto Adolfo Lutz, pelo espaço físico e equipamentos e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP.

1. Introdução e Justificativa

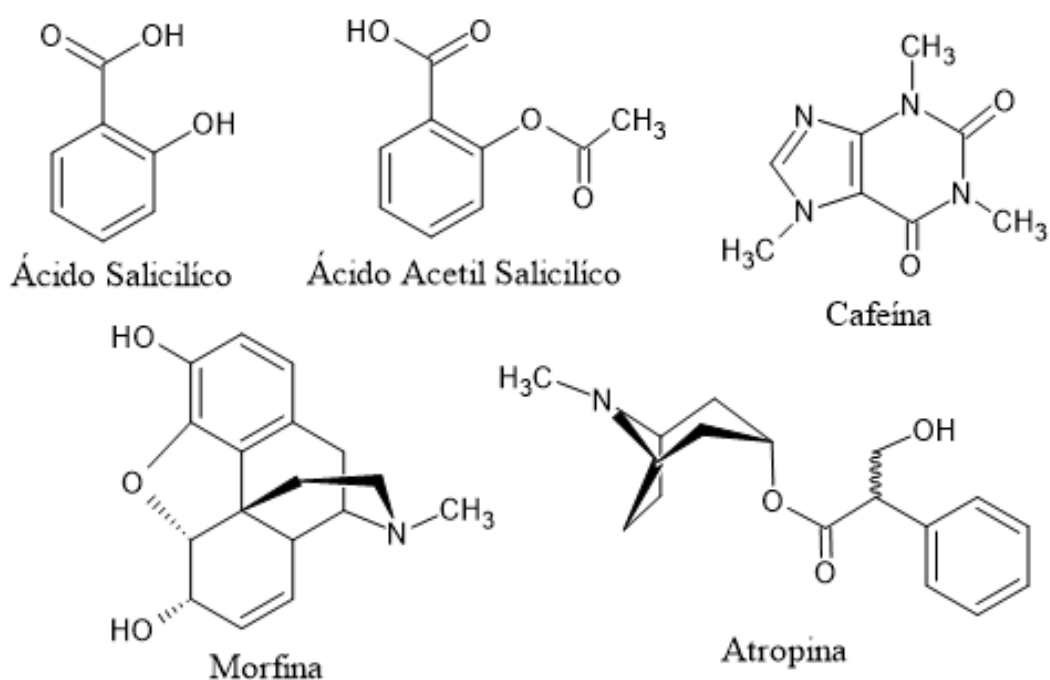
1.1 A Química dos Produtos Naturais

A utilização de produtos naturais se origina na antiguidade, onde os registros mais antigos para o uso de plantas medicinais são encontrados em placas de argila pertencentes à Mesopotâmia, cerca de 2400 a.C. (ATTINGER, 2008 *apud*, WOLFENDER *et al* 2014).

A história das civilizações Oriental e Ocidental descreve inúmeras formas de utilização de recursos vegetais, sendo a civilização Chinesa conhecida pelos seus preparados para fins medicinais. No Egito produtos naturais eram utilizados nas mumificações e na produção de pigmentos, enquanto que na Idade Antiga muitos venenos foram descobertos e utilizados na execução de prisioneiros (DEWICK, 2009).

Quando se trata de produtos naturais nos quais os derivados são utilizados até hoje, 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), utilizado até hoje como analgésico. Além desses compostos, existem diversos outros exemplos de produtos naturais empregados na farmacológica tais como morfina, atropina e cafeína, como visto na Figura 1 (NEWMAN, D.J; CRAGG 2020).

Figura 1. Alguns dos primeiros compostos isolados e derivados de planta



Fonte: Autoria Própria

Atualmente, o conhecimento sobre produtos naturais tem direcionado pesquisas na área de química orgânica para a descoberta de novos compostos de origem vegetal, denominados metabólitos especiais, também conhecidos como metabólitos secundários, que são pequenas moléculas originadas do metabolismo de fauna e flora (GHORBANPOUR & VARMA 2017).

Esses metabólitos especiais têm importantes funções ecológicas nas espécies, possuindo, por exemplo, ação contra herbívoros e patógenos, servindo de atrativo para polinização e funcionando como agentes de competição e simbiose entre plantas e microrganismos. A fitoquímica, campo da química que estuda esses metabólitos especiais, possui a finalidade de extrair, quantificar, caracterizar as estruturas e elucidar as propriedades químicas e biológicas, tendo em destaque a descoberta de compostos que apresentem atividade biológica (FILHO, 2010). Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis atualmente são derivados de plantas e microrganismos, a importância no isolamento de novos compostos derivados de plantas não está somente na atividade biológica dos mesmos, está também na síntese de moléculas mais complexas (DUTRA, et al., 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização estrutural de metabólitos especiais presentes nos galhos da espécie *Nectandra leucantha*, especialmente aqueles que apresentem atividade antiparasitária frente ao *Trypanosoma cruzi*.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 *Nectandra leucantha*

Nectandra leucantha é uma espécie da família Lauraceae, que é composta por cerca de 2.500 espécies distribuídas em cerca de 50 gêneros e encontrada em climas tropicais e subtropicais especialmente na África, Américas Central e do Sul, Ásia e Austrália. No Brasil são encontrados 23 gêneros, 418 espécies sendo 211 endêmicas, que habitam em sua maior parte as Florestas Pluviais, Restingas e Cerrados. Comumente conhecida pelo seu grande valor econômico e medicinal, as Lauráceas têm sido amplamente utilizadas na indústria madeireira (*Mezilaurus itauba*), além de ser utilizada de forma medicinal (*Cinamomum camphora*) e como alimento (*Persea americana* e *Cinamomum zeylanicum*) (GOTTLIEB, 1972; QUINET *et al.*, 2011).

Entre as espécies com valor medicinal relata-se aquelas com ações contra dores e cólicas, dor de estômago, ação hipotensora, sudorífero, anti-reumático, anti-sifilítico, vermífugo, antiespasmódicos, entre outros (WANDERLEY *et al.*, 2003).

Sobre os vários constituintes químicos da família Lauraceae, destacam-se alcaloides, ésteres benzoicos, arilpropanoides, nitro-derivados, 2-pironas, flavonoides, benzofenonas, mono e sesquiterpenos, dentre outros metabólitos.

O gênero *Nectandra* é um dos maiores dentro da família Lauraceae, no Brasil são encontrados 43 representantes, o gênero possui alto valor econômico devido a madeira de boa qualidade, sendo utilizada pela indústria moveleira e construção civil (WANDERLEY *et al.*, 2003). Quimicamente, o gênero *Nectandra* é composto predominantemente por alcaloides e lignoides, sendo as lignanas e neolignanas os metabólitos mais encontrados, seguidos por terpenoides, esteroides, fenilpropanoides e flavonoides. Outros derivados minoritários são açúcares e ácidos graxos, cumarinas, benzofenonas, derivados de ácido benzoico, xantonas e lactonas (GARCEZ *et al.*, 2009; GARCEZ *et al.*, 2010; GRECCO *et al.*, 2015; GRECCO *et al.*, 2016; WANDERLEY *et al.*, 2003).

A *N. leucantha* é uma árvore de até 15 metros, com folhas alternas no ápice dos râmulos, sendo elas ovadas ou elípticas ou elíptico-lanceoladas como visto na Figura 2. Nessa figura é possível observar as inflorescências, que se dão nas axilas das folhas distais, pauciflora a submultiflora, sendo a flor mais curta que as folhas e os frutos globosos, elipsoides, crateriforme a trompetiforme. Esta espécie é encontrada apenas no Brasil e sua distribuição ocorre nos estados de MG, RJ, SP, PR e SC (WANDERLEY *et al.*, 2003).

Figura 2. Flores e Galhos de *Nectandra leucantha*.



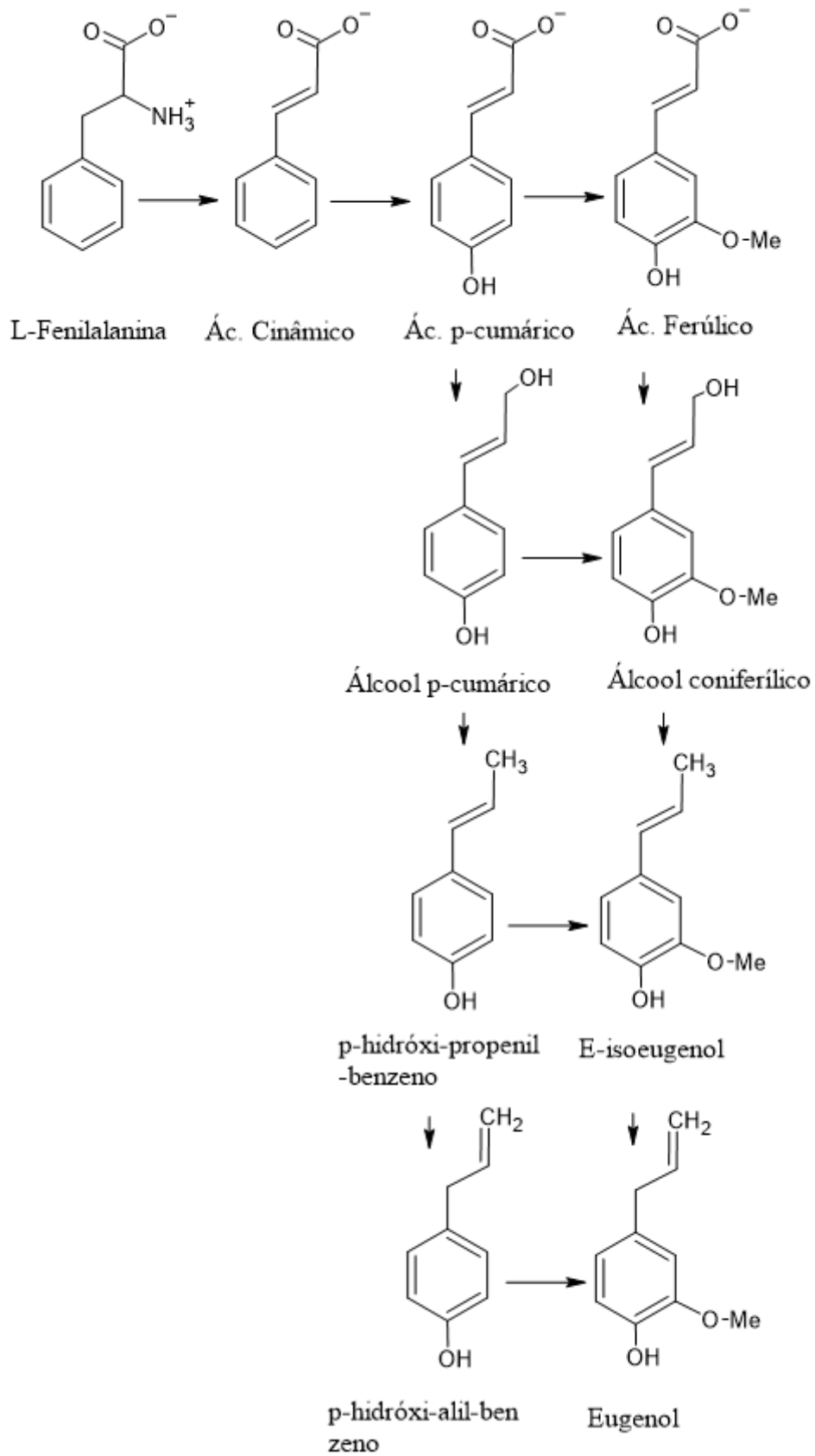
Fonte: Flora Digital. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4384

2.2 Lignanas e Neolignanas

Lignoides são uma classe de produtos naturais com uma vasta diversidade estrutural formadas pela dimerização de fenilpropanoides (C6-C3) (ASSIS, 2013; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

Os propenilfenóis possuem como esqueleto fundamental a unidade C6-C3, que são provenientes dos aminoácidos L-fenilalanina. A via fenilpropanídica se inicia pela desaminação da L-fenilalanina pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL), transformando a L-fenilalanina no ácido cinâmico, que sofre hidroxilação e posteriormente redução, resultando no álcool *p*-cumárico. A biossíntese segue com várias reações, hidroxilação do anel aromático, metilação, formação de tioéster, coenzima A e redução (Figura 3) (DEWICK 2009; FUNASAKI, 2006)

Figura 3. Algumas Etapas Biossintéticas da Formação de Precursores de Lignanas e Neolignanas

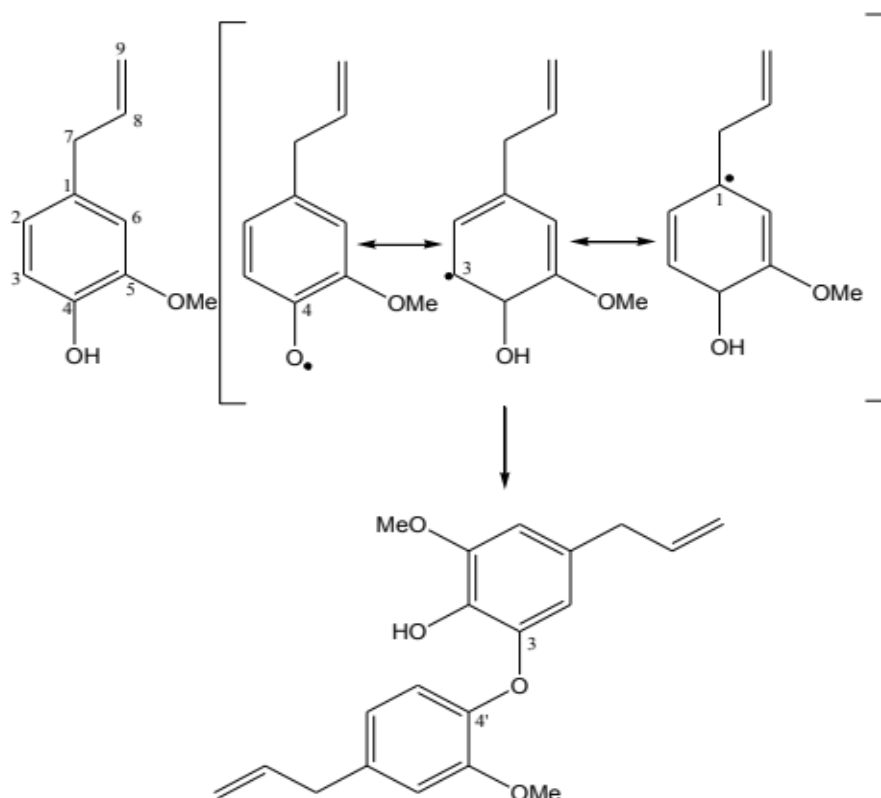


Fonte: autor, adaptado de Sartorelli (2000).

As lignanas e neolignanas são classes de metabólitos com grande diversidade química e atividades farmacológicas expressivas. No que tange suas classificações, existem duas definições, sendo a primeira definida pela forma como duas unidades C₆C₃ são ligados entre si, ou seja, para as lignanas pela posição 8 e 8' da cadeia alifática, enquanto que as neolignanas são isentas dessa ligação. A outra definição, proposta pelo Prof. Otto R. Gottlieb, e seguida por nosso grupo de pesquisa, seria de as lignanas são substâncias diméricas formadas por fenilpropanoides, como o álcool coniferílico por exemplo, enquanto as neolignanas são formadas por fenilpropanoides como o iso-eugenol e o eugenol (SOUZA *et al.*, 2012; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

Os compostos isolados neste trabalho constituem-se de neolignanas, ou seja, são formados a partir do acoplamento ocorrido entre a posição 3 e a hidroxila de uma molécula não oxidada no carbono β da cadeia alifática (posição C9), o eugenol, como observado na figura 4 (SARAIVA, 2018).

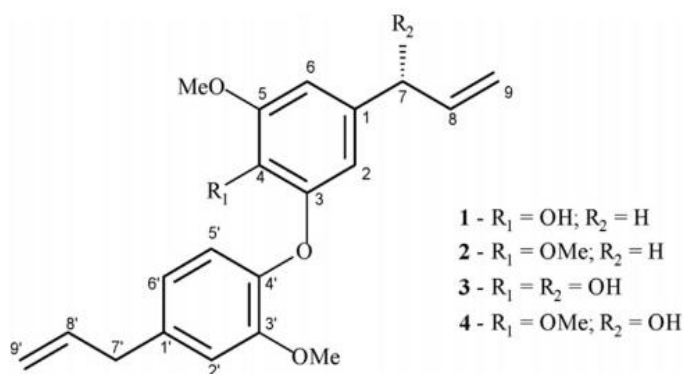
Figura 4. Formação das neolignanas do tipo 3-O-4', isoladas neste trabalho.



Fonte: (SARAIVA, 2018)

Estudos anteriores com *N. leucantha* foram realizados por Grecco *et al.* (2017), onde quatro neolignanas (Figura 5), foram obtidas do fracionamento biomonitorado do extrato hexânico das folhas desta espécie. Dentre esses compostos, as neolignanas **1** – **4** apresentaram atividade contra formas amastigotas ou tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

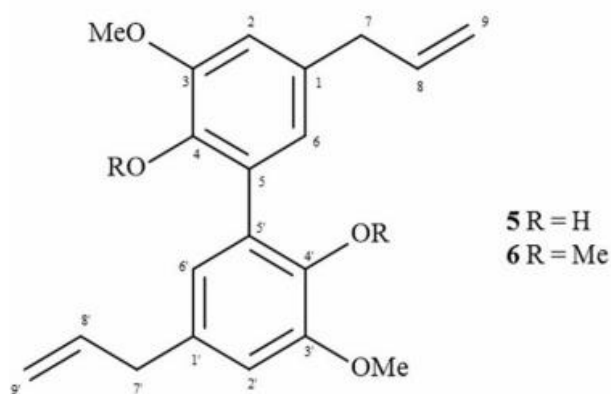
Figura 5. Estruturas das neolignanas **1** – **4** isoladas de *N. leucantha*



Fonte: Grecco *et al.* (2017)

Em continuação a esse estudo foram isoladas mais duas neolignanas (**5** e **6**, Figura 6) do extrato MeOH das folhas desta espécie, as quais apresentaram atividade contra formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*.

Figura 6. Estruturas das neolignanas **5** e **6** isoladas de *N. leucantha*.



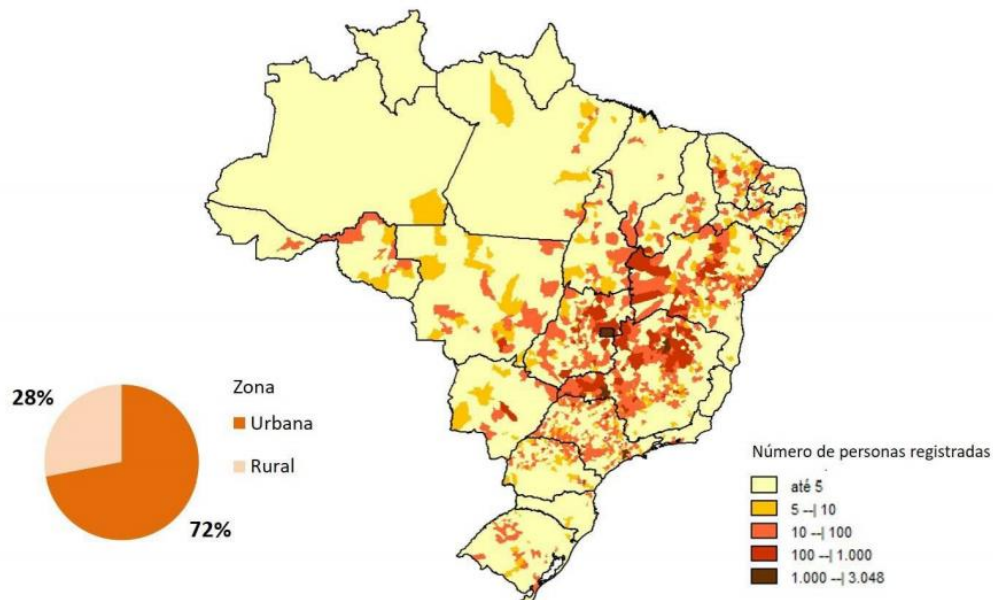
Fonte: Grecco *et al.* (2018)

Tendo em vista o potencial antiprotozoário dos compostos majoritários bioativos isolados das folhas de *Nectandra leucantha*, neste trabalho foi realizado o isolamento e caracterização dos compostos presentes nos galhos de *N. leucantha*, bem como a realização de testes biológicos *in vitro* de tais compostos contra *Trypanosoma cruzi*.

2.3 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é o protozoário responsável pela infecção parasitária denominada doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Essa doença acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria na América Latina. No Brasil, em 2015 foram registrados 70.241 casos confirmados da doença, esses registros estão distribuídos em todo território nacional, sendo em maior número, residentes da área urbana, como visto na Figura 7, fato justificável pela alta migração populacional da área rural para residencial. Quanto à mortalidade, no período de 2007 a 2017, foram registradas 51.293 mortes pela doença, uma média de 4.663 por ano (SAÚDE, 2020; WHO, 2018).

Figura 7. Distribuição de cadastros autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, Brasil, dez/2015.



Fonte: Sistema de Informação de Atenção Básica/ Ministério da Saúde (2020)

Segundo o Ministério da Saúde (2020), a doença de Chagas é uma doença silenciosa e silenciada, pois seu curso clínico é lento e frequentemente assintomático e também porque afeta, principalmente, pessoas pobres que não têm voz política ou acesso a serviços de saúde.

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 ou durante a gravidez, da mãe contaminada para o filho, em relação à transmissão no Brasil, atualmente a forma oral, por alimentos contaminados, é a principal. (FIOCRUZ, 2013)

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).

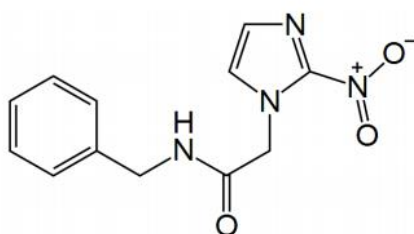
O *T. cruzi* é um protozoário que apresenta três formas evolutivas: epimastigota (forma presente no vetor ou em cultura pura), tripomastigota (forma infectante) e amastigota (forma que se multiplica dentro das células dos hospedeiros). Sua transmissão ocorre quando o vetor infectado se alimenta e deposita suas fezes e/ou urina contendo a forma infectante. A picada causa uma irritação, provocando coceira, permitindo assim que o parasita atravesse 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).

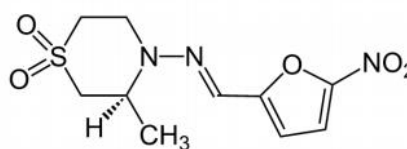
As manifestações clínicas podem ser divididas em duas fases, a aguda e a fase crônica, sendo elas sintomáticas ou não. A fase aguda possui como sintomas mais gerais, uma inflamação nos tecidos da região, na pele uma mancha avermelhada é formada, quase sempre dolorosa, essas lesões iniciais são acompanhadas de "ínguas" próximas do local de contaminação, quando essa contaminação é próxima a região conjuntiva, temos o denominado sinal de romaña, os sintomas menos frequentes, seriam, a insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas. A fase crônica sintomática ocorre em órgãos específicos, como, o coração, esôfago ou cólon, resultando em duas grandes formas da doença: a cardíaca, que envolve a insuficiência cardíaca ou cardiomegalia, e a forma digestiva, que causa alterações funcionais e morfológicas principalmente no esôfago e cólon, podendo desenvolver aumento da lesão tecidual, distensão abdominal, dor e regurgitação (ÁLVAREZ *et al.*, 2014; FIOCRUZ, 2013; DIAS; COURA, 1997).

As drogas disponíveis para o tratamento (cura parasitológica na fase aguda) apresentam toxicidade dose-dependente, sendo elas benzonidazol e nifurtimox (Figura 8). Os efeitos colaterais mais comuns da droga 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 8. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas



Benzonidazol



Nifurtimox

Assim, apesar desses medicamentos serem utilizados no tratamento da doença de Chagas, não proporcionam o resultado ideal. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz, o melhor medicamento para a doença de Chagas deve ser barato, de fácil aplicação e acessível aos pacientes, não causar efeitos colaterais importantes e nem induzir resistência parasitária, produzir cura parasitológica de casos agudos e crônicos, evitar a evolução da doença e ser eficaz com poucas doses num curto prazo (CASTRO & SOEIRO, 2017).

Assim, fica evidente a importância da busca por novos medicamentos para essa doença, onde os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos moleculares para tanto.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e caracterização estrutural dos metabólitos especiais presentes no extrato hexânico dos galhos de *N. leucantha*, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Após isolamento e caracterização estrutural, o potencial das substâncias foi avaliado frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a coleta e secagem dos galhos da espécie *N. leucantha* para produção de extrato hexânico;
- Fracionar o extrato bruto e isolar os compostos majoritários usando diferentes métodos cromatográficos.
- Caracterizar a estrutura das substâncias isoladas, utilizando ressonância magnética nuclear (RMN);
- Avaliar a atividade biológica dos compostos majoritários isolados contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

4 Procedimento

4.1 Equipamentos

As coordenadas geográficas da espécie que foi coletada foram determinadas por tecnologia GPS com aplicativo do Google Maps®.

Os galhos de *N. leucantha* foram moídos 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 com transluminador ultravioleta (λ 254 e 365 nm), da marca Spencer.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (500 MHz) foram registrados em espectrômetros Varian – modelo INOVA 500, com tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os espectros foram processados no software MNova v. 6.0.2-5475, da Mestrelab Research S. L.

4.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados nos processos de extração, purificação e identificação foram de grau P.A., da marca CAAL (Casa Americana de Artigos para Laboratórios).

Para as análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H foram utilizados os solventes deuterados CDCl_3 da Cambridge Isotope Laboratories.

As revelações das cromatofolhas foram realizadas por aspersão da solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ - sulfato cérico 2%.

4.3 Procedimentos Cromatográficos

Nas separações cromatográficas em colunas gravitacionais, foram utilizados como fases estacionárias; sílica gel 60 (63 – 210 μm de diâmetro de partícula), da Merck, ou Sephadex® LH-20, da GE Healthcare.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas como fase estacionária cromatofolhas de sílica-gel 60 F254 (indicador fluoresceína) com 0,25 mm de espessura, da marca Macherey-Nagel.

4.4 Coleta do Material Vegetal

Os galhos de *N. leucantha* foram coletados, em junho/2018, de um espécime previamente identificado no Parque Ecológico do Perequê, Cubatão/SP, cujas coordenadas (GPS) foram determinadas em campo. Todo o material coletado foi fotografado e imediatamente prensado no campo, recebendo o número do coletor e o SISGEN A4123E4. Uma exsicata foi depositada na coleção do Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

4.5 Obtenção dos Extratos

Após secagem ao ar livre e moagem, foram obtidos 158 g de galhos que foram submetidos à extração com hexano até esgotamento. As soluções foram evaporadas no rotaevaporador, fornecendo o extrato hexânico (EH –1,80 g).

4.6 Fracionamento e Caracterização Química

A fim de isolar compostos com atividade antiparasitária, 1,80 g de extrato hexânico de *N. leucantha* foi fracionado em cromatografia gravitacional em gel de sílica utilizando-se misturas de solventes em polaridade crescente (Hexano/Acetato de Etila/Metanol). Desse fracionamento foram obtidas 362 frações, com volume aproximado de 5 ml cada, que após evaporação do solvente foram submetidas à análise de cromatografia de camada delgada e reunidas, de acordo com a similaridade observada, em 11 grupos, como visto na Tabela 1.

Tabela 1. Frações, agrupamentos e massas após fracionamento do extrato hexânico de *N. leucantha*.

Frações	Grupos	Massa (mg)
1-51	NLEH-1	78,9
52-67	NLEH-2	155,5
68-81	NLEH-3	24,8
82-97	NLEH-4	80,1
98-107	NLEH-5	26,0
108-127	NLEH-6	10,8
128-205	NLEH-7	143,3
206-249	NLEH-8	138,7
250-295	NLEH-9	160,1
296-343	NLEH-10	521,2
344-362	NLEH-11	72,1

Após o fracionamento, as amostras foram submetidas à RMN de ^1H , sendo possível inferir que o composto **I** encontrava-se, na forma pura, nos grupos NLEH-3, NLEH-4, NLEH-5 enquanto que o composto **II** foi isolado do grupo NLEH-2.

4.7 Avaliação das Atividades Antiparasitárias *in vitro*

Os ensaios para detecção de substâncias com atividade antiparasitária foram realizados no Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, 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.

4.7.1 Avaliação da Atividade Tripanossomicida

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram retiradas de camundongos (*Mus musculus*) previamente infectados intraperitonealmente e empregadas para infectar culturas celulares LLC-MK2 (células epiteliais de rim de Macaca mulata – ATCC CCL 7), cultivadas em meio RPMI-1640 com 2% de soro fetal bovino (SFB). As culturas de células infectadas foram mantidas à temperatura de 37°C em estufa com 5% CO₂ (KESPER *et al.*, 2000; REIMÃO *et al.*, 2010).

4.7.2 Células de Mamífero NCTC

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do *American Type Culture Collection* (ATCC CCL-1), foram fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70°C. Posteriormente, foram mantidas em meio M-199 suplementado com 10% SFB, sob a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂ (CORRÊA *et al.*, 2011).

4.7.3 Determinação *in vitro* da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀)

Os compostos **I** e **II** foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e incubados com os parasitas para se estabelecer as respectivas CE₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou 0,5% para não causar danos aos parasitas. Os compostos foram diluídos em série empregando-se meio RPMI-1640, em placas de 96 poços e, em seguida, formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração de 1x10⁶ parasitas/poço. As placas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período, para a averiguação da viabilidade dos parasitas, foram adicionados 20 µL de resazurina a 10% e as placas foram incubadas por mais 20 horas sob as mesmas condições.

Posteriormente, a leitura da placa foi realizada por absorvância em espectrofotômetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) a 570 nm (GEHRKE *et al.*, 2013).

Utilizou-se como controle positivo, o fármaco padrão benzonidazol e como controle negativo, células não tratadas.

4.7.4 Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada em células NCTC (clone 929), na concentração de 6×10^4 células/poço. As células foram incubadas com os compostos em diluição seriada (200 – 0,42 μ M) dos mesmos com meio M-199 e 10% SFB em placas de 96 poços. Posteriormente, as células foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Na sequência, adicionou-se 20 μ L de resazurina a 10%, em todos os poços, incubando-se por mais 20 horas, sendo a leitura realizada da mesma forma como descrito anteriormente. A fim de se determinar a toxicidade dos compostos com efetiva atividade antiprotozoária, calculou-se o Índice de Seletividade (IS) através da seguinte expressão:

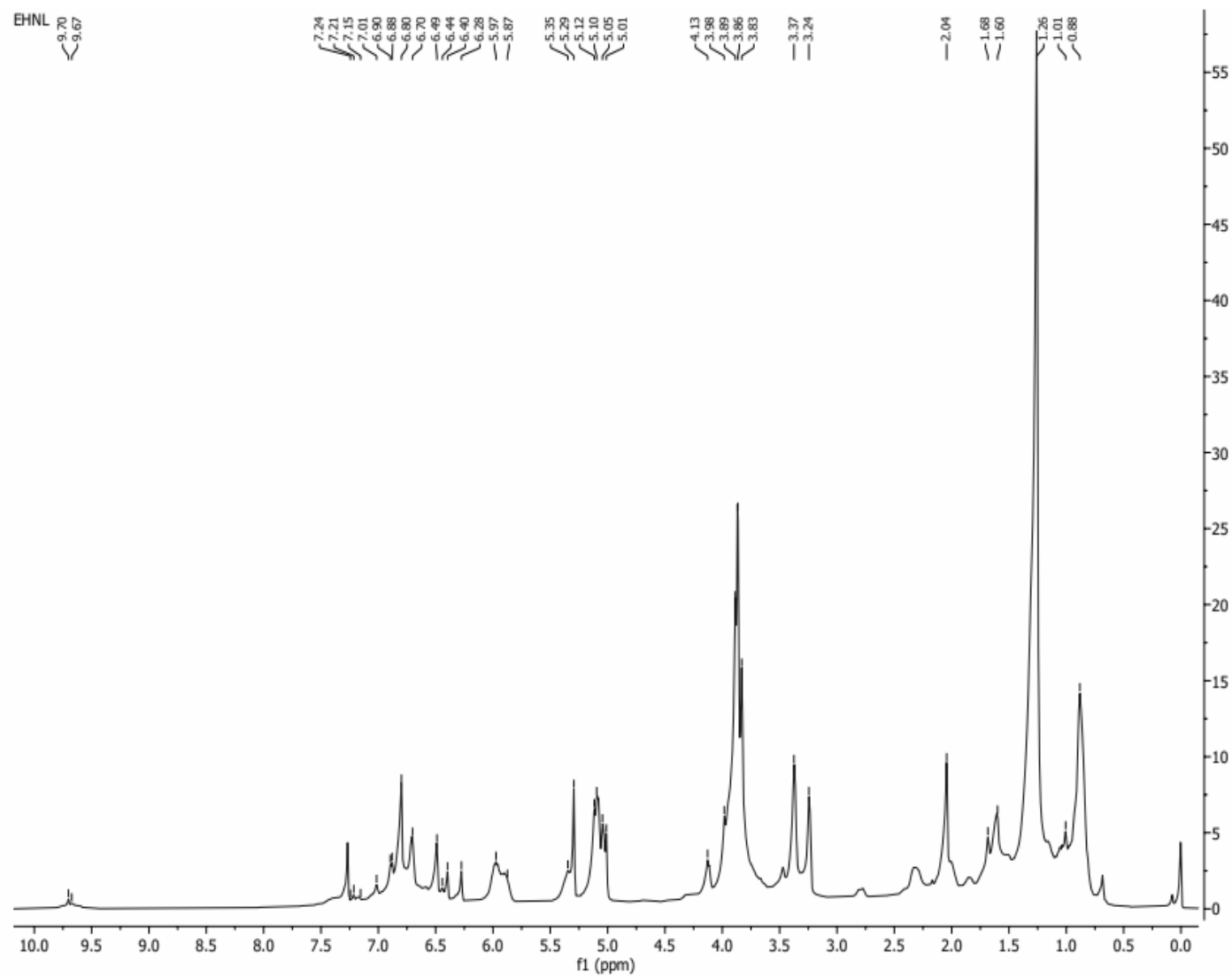
$$IS = \frac{\text{Toxicidade}(CC_{50} \text{ em células de mamífero NCTC})}{CE_{50} \text{ em células de parasitas}}$$

5 Resultados e Discussão

Primeiramente o espectro de RMN de ¹H do extrato hexânico foi registrado, a fim de se avaliar a composição química do mesmo. De acordo com o demonstrado na Figura 9, foi possível observar a presença de dois dupletos em δ_H 3,23/3,24 e δ_H 3,36/3,37, de simpletos em δ_H 3,83, 3,86 e 3,89 referentes a metoxilas, dois multipletos em δ_H 5,07 e 5,96 referentes a hidrogênios alílicos da cadeia lateral e sinais entre δ_H 6,27 e 6,92, região característica de anel aromático. Com base nesses resultados, foi possível sugerir que esse extrato é composto por derivados da classe dos lignoides.

Assim, após fracionamento cromatográfico, o extrato hexânico (EH) forneceu duas neolignanas: deidrodieugenol B (**I**) e metil deidrodieugenol B (**II**), cujo processo de identificação encontra-se descrito a seguir.

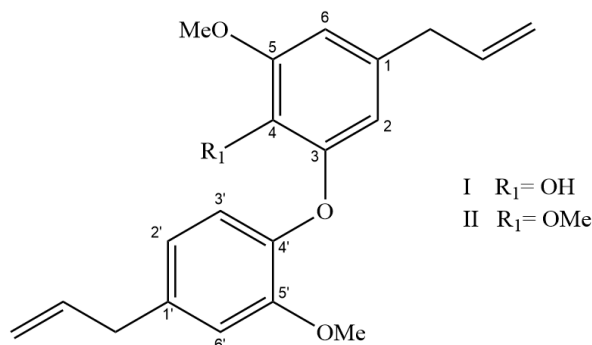
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do extrato hexânico dos galhos de *N. leucantha*.



5.1 Identificação dos compostos I e II

As estruturas dos dois compostos isolados dos galhos de *N. leucantha* (Lauraceae) estão apresentadas na Figura 10, abaixo.

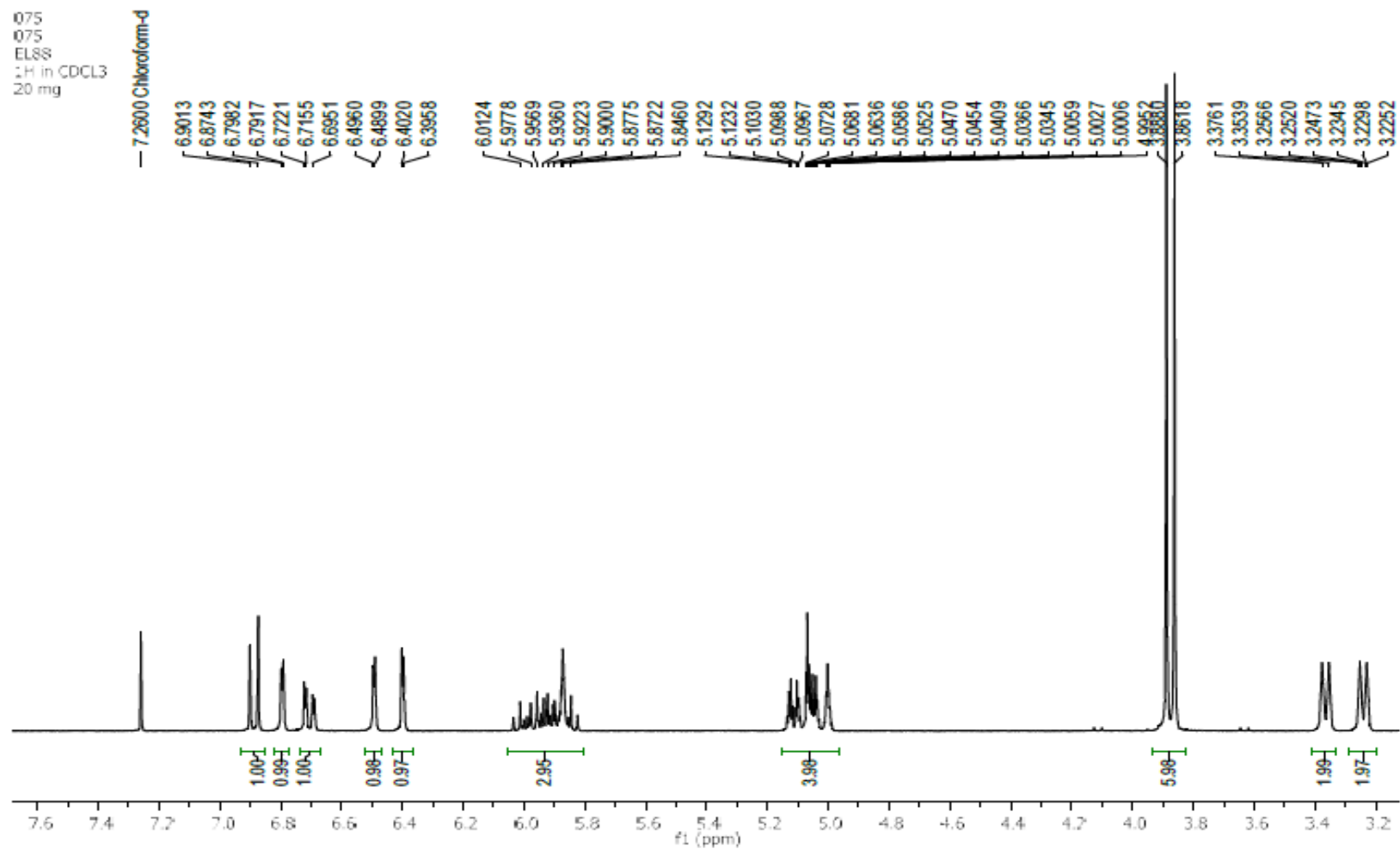
Figura 10. Estruturas moleculares dos compostos **I** e **II**



Fonte: Autoria Própria

No espectro de RMN de ^1H do composto **I** (Figura 11) foi possível observar dois dupletos em δ_{H} 3,23 (d, $J = 6,7$ Hz, H-7) e δ_{H} 3,36 (d, $J = 6,7$ Hz, H-7') e dois multipletos em δ_{H} 5,06 (H-9 e H-9') e em δ_{H} 5,93 (H-8 e H-8') referentes a duas cadeias alílicas. Além desses, foram observados dois simpletos em δ_{H} 3,86 (5-OMe) e 3,89 (5'-OMe), os quais foram atribuídos a dois grupos metoxílicos. Foi possível constatar a presença de dois dupletos em δ_{H} 6,39 ($J = 1,8$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,49 ($J = 1,8$ Hz, H-2), referentes aos hidrogênios de um anel aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído, além de sinais característicos de hidrogênios de um segundo anel aromático, porém 1,2,4-trissubstituído, devido aos sinais em δ_{H} 6,70 (dd, $J = 8,1$ e 1,9 Hz, H-2'), δ_{H} 6,79 (d, $J = 1,9$ Hz, H-6') e δ_{H} 6,89 (d, $J = 8,1$ Hz, H-3'). Assim, os dados espectrais obtidos se mostraram idênticos aos obtidos por Grecco *et al* (2016) e permitiram a identificação do composto **I** como sendo deidrodieugenol B.

Esse composto foi identificado previamente das folhas de *N. leucantha* (Grecco *et al.* 2016) e apresentou atividade frente a *Leishmania donovani* (COSTA-SILVA, *et al.*, 2015). Recentemente, o composto **I** foi descrito em outra espécie de Lauraceae, a *Endlicheria paniculata*, no estudo desenvolvido por Souza *et al.* (2020). Neste trabalho, o deidrodieugenol B foi utilizado na avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo experimental.

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H do composto I (δ , CDCl_3 , 500 MHz).

O espectro de RMN de ^1H do composto **II** (Figura 12) apresentou como única diferença em relação ao espectro do composto **I** a presença de três simpletos em δ_{H} 3,83 (5-OMe) e δ_{H} 3,87 (4-OMe e 5'-OMe), referentes a três metoxilas. Desta forma, a estrutura desse composto foi identificada como do metil deidrodieugenol B, cuja ocorrência foi descrita pela primeira vez no extrato das folhas de *N. leucantha* pelo nosso grupo de pesquisa (COSTA-SILVA et al, 2015).

Figura 12. Espectro de RMN de ^1H do composto II (δ , CDCl_3 , 500 MHz)

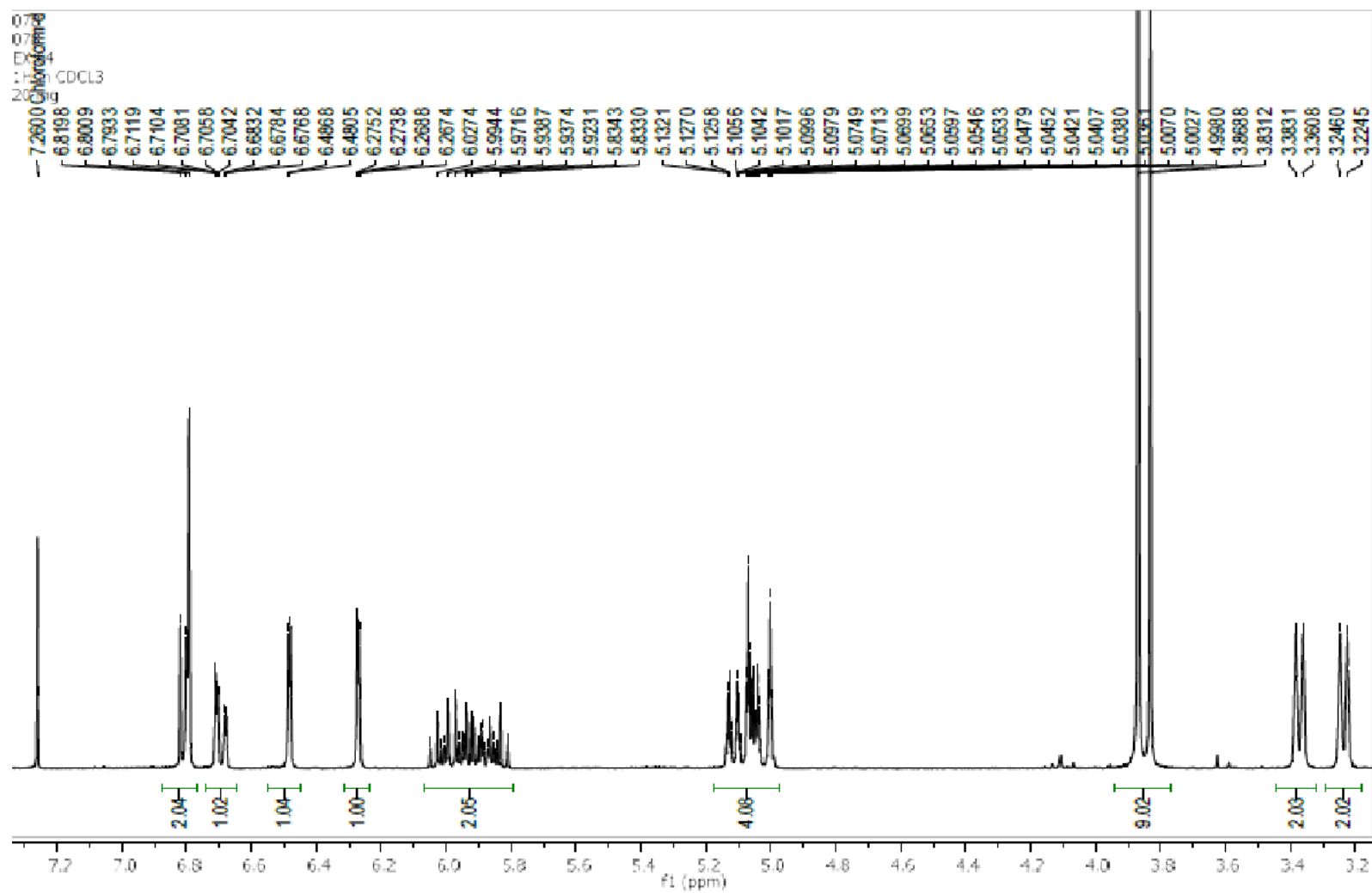


Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ , CDCl_3 , 500 Hz) para compostos I e II.

Substâncias	I	II	I ^a	II ^a
Posições	δH (mult., J/Hz)	δH (mult., J/Hz)	δH (mult., J/Hz)	δH (mult., J/Hz)
1	-	-	-	-
2	6,40 (d, 1,8)	6,40 (d, 1,9)	6,49 (d, 1,8)	6,48 (d, 1,9)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,48 (d, 1,8)	6,27 (d, 1,9)	6,56–6,27 (d, 1,8)	6,56–6,27 (d, 1,8)
7	3,23 (d, 6,7)	3,23 (d, 6,5)	3,24 (d, 7)	3,24 (d, 7)
8	5,93 (m)	5,93 (m)	5,06–5,98 (m)	5,06–5,98 (m)
9	5,06 (m)	5,06 (m)	5,06–5,98 (m)	5,06–5,98 (m)
1'	-	-	-	-
2'	6,70 (dd, 1,9 e 8,1)	6,70 (dd, 2,0 e 8,0)	6,71–6,69 (dd, 8,1 e 2,0)	6,71–6,69 (dd, 8,1 e 2,0)
3'	6,89 (d, 8,1)	6,80 (d, 8,0)	6,90–6,81 (d, 8,1)	6,90–6,81 (d, 8,1)
4'	-	-	-	-
5'	-	-	-	-
6'	6,79 (d, 1,9)	6,79 (d, 2,0)	6,79 (d, 2,0)	6,79 (d, 2,0)
7'	3,36 (d, 6,7)	3,37 (d, 6,5)	3,36–3,39 (d, 6,7)	3,36–3,39 (d, 6,7)
8'	5,93 (m)	5,93 (m)	5,06–5,98 (m)	5,06–5,98 (m)
9'	5,06 (m)	5,06 (m)	5,06–5,98 (m)	5,06–5,98 (m)
4-OCH ₃	-	3,87 (s)	-	3,87 (s)
5-OCH ₃	3,69 (s)	3,83 (s)	3,89 (s)	3,87 (s)
5'-OCH ₃	3,86 (s)	3,87 (s)	3,86 (s)	3,83 (s)

^a Dados retirados da literatura, CDCl_3 , 300 Hz (GRECCO *et al.*; 2018).

5.2 Avaliação da Atividade Antiparasitária dos Compostos Isolados

O potencial antiparasitário dos compostos **I** e **II**, isolados do extrato hexânico de *N. leucantha*, foi avaliado *in vitro* frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e frente à citotoxicidade em células de mamíferos (NCTC), fornecendo os seguintes resultados:

Tabela 3. Atividades antiparasitárias e citotoxicidade dos compostos I e II.

Composto	CE ₅₀ / μ M ^a	CC ₅₀ / μ M ^b	IS ^c
I	38,6 \pm 4,1	> 200	> 5,2
II	>100	> 200	-
Benzonidazol ^d	16,4 \pm 0,8	> 200	> 12,2

^a CE50: 50% Concentração efetiva; ^b CC50: 50% Concentração citotóxica (células NCTC); ^c IS: Índice de Seletividade; ^d Fármaco padrão.

Os resultados obtidos nos ensaios antiparasitários frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, permitiram observar que o composto **I** apresenta atividade moderada, enquanto o composto **II** se mostrou inativo. Os ensaios de citotoxicidade frente às células mamíferas de NCTC mostram que os compostos **I** e **II** não apresentaram citotoxicidade na concentração máxima testada (200 μ M). Frente a esses resultados e considerando-se as estruturas moleculares de ambas as neolignanas, é possível observar que a metilação de **I** na posição C-4 no anel aromático para gerar o composto **II** resultou na perda da atividade anti *T. cruzi*, evidenciando que a presença do grupo fenólico é crucial para a atividade observada.

Adicionalmente, estudos realizados por Saraiva (2018) mostraram que derivados semissintéticos dos compostos **I** e **II** obtidos via hidrogenação catalítica, adição de heteroátomo na dupla ligação e oxidação da cadeia alquílica, apresentaram diferentes valores de CC₅₀ frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os compostos ativos frente ao parasita foram aqueles advindos do composto **I**, que sofreram esterificação na posição C-4 do anel, além de modificações na posição da ligação dupla da cadeia alifática. Além disso, todos esses compostos se mostraram atóxicos frente às células mamíferas de NCTC na concentração máxima testada (200 μ M). Quanto aos derivados do composto **II**, mesmo aqueles que sofreram hidroxilação na cadeia alifática, nenhum apresentou atividade frente às formas tripomastigotas. Sendo assim fica evidente que a atividade frente a formas tripomastigotas do parasita está diretamente ligada à presença da hidroxila fenólica.

6 Considerações finais

No presente trabalho, foi realizado o estudo do extrato hexânico dos galhos de *N. leucantha*, por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Desses processos foram obtidas duas neolignanas, identificadas como deidrodieugenol B e metil deidrodieugenol B. Após a caracterização via RMN, foi avaliado o potencial antitripanosoma dos compostos, sendo que o deidrodieugenol B apresentou atividade frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, enquanto que o metil deidrodieugenol B se mostrou inativo. Além disso, ambos os compostos se mostraram atóxicos frente às células mamíferas de NCTC na concentração máxima testada (200 μ M). Sendo assim, este estudo sugere que a presença do grupo fenólico é crucial para a atividade observada, o que permitiu inferir que o deidrodieugenol B pode ser utilizado no desenvolvimento de futuros protótipos moleculares para obtenção de novos medicamentos, em especial referente ao tratamento da doença de Chagas.

BIBLIOGRAFIA

ÁLVAREZ, J. M.; FONSECA, R.; DA SILVA, H. B.; MARINHO, C. R.; BORTOLUCI, K. R.; SARDINHA, L. R.; EIPHANIO, S.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-9, 2014.

ATTINGER, P. *La Médecine Mésopotamienne. Journal des médecines cunéiformes*, p. 1-96. Saint-Germain-En-Laye, 2008.

ASSIS, Igor Medeiros de. **Lignóides de Burseraceae da Amazônia**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4416/2/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Igor%20Medeiros%20de%20Assis.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2021.

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. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

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, ago. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1191/0960327106het653oa>. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/ez42.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1191/0960327106het653oa>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

CASTRO, S. L.; SOEIRO, N. C. Drogas Tripanossomicidas - Estudos Pré-Clínicos. Portal da Doença de Chagas, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>>. Acesso em: 20 Maio 2020.

CORRÊA, D. S.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q; TANIWAKI, N. N.; ROMOFF, P.; *et al.* Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitology Research**, 109, 231-236, 2011.

COSTA-SILVA, Thais Alves da; GRECCO, Simone S.; SOUSA, Fernanda S. de; LAGO, João Henrique G.; MARTINS, Euder G. A.; TERRAZAS, César A.; VARIKUTI, Sanjay; OWENS, Katherine L.; BEVERLEY, Stephen M.; SATOSKAR, Abhay R.. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 653-657, 2 abr. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np500809a>.

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. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/nf9bn>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900038&lng=en&nrm=iso>. acesso em: 01 Abr. 2019.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach, John Wiley e Sons Ltda, United Kingdom, 3^a ed., 2009.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 04-29, 2016.

FERREIRA, Daiane D.; SOUSA, Fernanda S.; COSTA-SILVA, Thais A.; REIMÃO, Juliana Q.; TORRECILHAS, Ana C.; JOHNS, Deidre M.; SEAR, Claire E.; HONORIO, Kathia M.; LAGO, João Henrique G.; ANDERSON, Edward A.. Dehydrodieugenol B derivatives as antiparasitic agents: synthesis and biological activity against *trypanosoma cruzi*. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 176, p. 162-174, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.001>.

FIOCRUZ (Brasil) (org.). **Doença de Chagas**. 2013. Revisado por ania Araujo-Jorge, do Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 23 abr. 2020

FUNASAKI, Mariko. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-15102006-000806/publico/teseMarikoFunasaki.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2021.

GARCEZ, F. R. *et al.* Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. **Quim. Nova**, v. 33, n. 8, p.1739-1742, 2010. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5758>. Acesso em: 2 abr. 2019.

GARCEZ, F. R. *et al.* Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p.407-411, 2009. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=561>. Acesso em: 2 abr. 2019.

GEHRKE, S. S.; PINTO, E. G.; STEVERDING, D.; PLEBAN, K.; TEMPONE, A. G.; HIDER, R. C.; WAGNER, G. K. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 21, 805-813, 2013.

GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. [S. l.] Springer International Publishing, 2017.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 11, p.1537-1570, 1972. Disponível em: [https://www.sciencedirect.ez42.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016/0031-9422\(72\)85001-5](https://www.sciencedirect.ez42.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016/0031-9422(72)85001-5)>. Acesso em: 30 mar. 2019.

GOTTLIEB, Otto; YOSHIDA, Massayoshi. Lignóides: com Atenção Especial a Química das Neoligananas. **Química Nova**, [s. l.], v. -, n. -, p. 250-273, out. 1983.

GRECCO, S. *et al.* Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p.133-137, 2015.

GRECCO, Simone S. *et al.* Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 27, n. 17-18, p.793-810, out. 2016. Elsevier

BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.07.009>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.07.009>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

GRECCO, S. *et al.* Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (Lauraceae) display *in vitro* antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 277, n. , p.55-61, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279717303496>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

GRECCO, Simone S. *et al.* Neolignans isolated from twigs of *Nectandra leucantha* Ness & Mart (Lauraceae) displayed *in vitro* antileishmanial activity. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.1-7, 27 set. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40409-018-0164-9>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

JURBERG, J. *et al.* **Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas)**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2014. 58 p. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triominio_jurberg.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2019.

KESPER, N. J. R.; DE ALMEIDA, K. A.; STOLF, A. M.; UMEZAWA, E. S. Immunoblot Analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **Journal of Parasitology**, 86, 862-867, 2000.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. (2020) Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.* 83 (3) 770–803, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

QUINET, A.; Baitello, J.B.; Moraes, P. L.R. 2011. Lauraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB078445>. Acessado: 20 de outubro de 2011.

SARAIVA, Fernanda Samara de Sousa. **Metabólitos Naturais dos Galhos de *Nectandra leucantha* Nees & Mart. (Lauraceae) e Derivados Semissintéticos – Caracterização Molecular, Avaliação do Potencial e Mecanismo Antitumoral Contra o Melanoma Murino**. 2018. 2 v. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2018.

SARTORELLI, Patrícia. **Biossíntese de neolignanas benzofurânicas em *Piper regnellii* (Piperaceae)**. 2000. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. doi:10.11606/T.46.2019.tde-04072019-155944. Acesso em: 2021-05-01.

SOUZA, Vanessa A. de; NAKAMURA, Celso V.; CORRÊA, Arlene G.. Antichagasic Activity of Lignans and Neolignans. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120017>.

SOUZA, Rafael Aparecido Carvalho; FERREIRA, Bruno Antonio; MOURA, Francielle Borges Rosa de; SILVA, Tiara da Costa; CAVALCANTI, Felipe; FRANCA,

Eduardo de Faria; SOUSA, Raquel Maria Ferreira de; FEBRONIO, Jenifer de Lima; LAGO, João Henrique Ghilardi; ARAÚJO, Fernanda de Assis. Dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 147, p. 104767-104778, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104767>.

SOUSA, G. S. **Tratado Descritivo do Brasil em 1587**. Rio de Janeiro: Typographia Universal de Laemmert, 1851. 422 p. Disponível em: <<https://digital.bbm.usp.br/handle/bbm/4795>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

SUAREZ, M., *et al.* (1983) Studies of Colombian Lauraceae. Dehydrodieugenols from *Nectandra polita*. *Phytochemistry*. 22, 2, 609-610.

REIMÃO, J. Q.; SCOTTI, M. T.; TEMPONE, A. G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: in vitro evaluation and structure- activity relationship study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 18, 8044-8053,2010.

WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo Online**. São Paulo: Rima, 2003. v. 3 Disponível em: <<http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-III.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 2 abr. 2019.

WOLFENDER, J. L.; David, B.; Dias, D. A. (2014). **The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends**. *Phytochem. Rev.* 14, 299–315. doi: 10.1007/s11101-014-9367-