



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINE GRIEBLER

**ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA E ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE EXTRATOS DE
SEMENTES DE *Lonchocarpus cultratus***

CASCAVEL – PR

2017

ALINE GRIEBLER

**ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA E ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE EXTRATOS DE
SEMENTES DE *Lonchocarpus cultratus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Antonio Alves da Silva

CASCADEL – PR

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G861a Griebler, Aline
Atividade anti-bacteriana e anti- *Trypanosoma cruzi* de extratos de sementes de *Lanchoarpus cultratus*. / Aline Griebler. — Cascavel, 2017. 85 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge
Coorientador: Prof. Dr. Edson Antonio Alves da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. Doença de Chagas. 2. Fabaceae. 3. Citotoxicidade. I. Jorge, Tereza Cristina Marinho. II. Silva, Edson Antonio Alves da. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.3
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

ALINE GRIEBLER

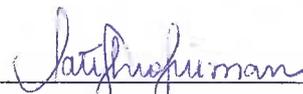
ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA E ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE EXTRATOS DE
SEMENTES DE *Lonchocarpus cultratus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Antonio Alves da Silva

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Tatiana Tiومان
UTFPR, Toledo - PR



Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli
UNIOESTE, Cascavel - PR



Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge
UNIOESTE, Cascavel - PR

CASCADEL – PR

2017

BIOGRAFIA

Aline Griebler, nascida em Aratiba, Rio Grande do Sul, em 10 de fevereiro de 1982, possui graduação em Farmácia Clínica e Industrial, pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (2004), pós-graduação MBA em Gestão Estratégica de Tecnologia e Inovação, pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR (2009), pós-graduação em Gerenciamento de laboratório, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE (2008), especialização em Manipulação Magistral Alopática e Cosmetologia, pelo Instituto Magistral Centro de Qualificação Profissional (2005). Atuou como farmacêutica responsável técnica do Centro de Equivalência Farmacêutica da Biocinese - EQFAR 56 (2007 - 2009) e como supervisora e gerente do laboratório de controle de qualidade da Indústria de Medicamentos Prati, Donaduzzi & Cia Ltda (2009 - 2014). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em controle de qualidade de medicamentos. Atualmente, cursa o programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em Cascavel – PR (2015 – 2016).

Dedico mais esta conquista a Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meu caminho;

Aos meus pais, Clarice e João, pelas grandes oportunidades que sempre me proporcionaram e pelo amor incondicional;

Ao meu noivo Matheus, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me guiou durante todo o trabalho, proporcionando-me saúde, sabedoria, e me cercou de pessoas favoráveis à realização desta conquista;

Aos meus pais, João e Clarice, que me deram todo apoio e suporte, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida e estão sempre ao meu lado;

Ao meu irmão, Diego, pela torcida, amor e companheirismo;

Ao meu noivo, Matheus, pelo amor, paciência, ajuda e incentivo durante todo o trabalho;

Aos meus familiares, amigos e colegas do programa, pelo apoio, carinho e incentivo;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge, pela oportunidade de aprendizado, amizade, paciência, inspiração e disponibilidade durante todo o desenvolvimento da orientação. Seus ensinamentos ficaram registrados como exemplo de vida. Com carinho e grande respeito, meus sinceros agradecimentos pela honra de ter sido sua aluna;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edson Antonio Alves da Silva, pela paciência, dedicação, pela ajuda com a estatística e por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas;

Ao Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli, pela grandiosa colaboração, disposição, ensinamentos transmitidos neste trabalho e por ceder o laboratório de Imunologia para realização da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra e à Prof^a. Dr^a. Nereida da Rosa Gioppo, pela disposição, paciência e ensinamentos que tanto contribuíram ao trabalho e por disponibilizar seus laboratórios de trabalho para a realização de ensaios analíticos;

À banca examinadora, composta pela Prof^a. Dr^a. Tatiana Tiuman (UTFPR) e pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli (UNIOESTE), pela disponibilidade em contribuir com este trabalho;

Aos técnicos e professores do laboratório de química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, pela realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear;

Aos colegas de laboratório Aline Maciel Bortoluzzi e Patrícia Karoline de Mattos, pelo companheirismo, compreensão e auxílio na realização do trabalho;

Aos alunos Andressa Almeida, Igor Oliveira, Luana Siqueira, Mariana Marinho Jorge e Izabela Virginia Staffen, pela colaboração e por estarem sempre dispostos a ajudar no que precisasse;

À aluna Jéssica Patrícia Borges da Silva e à Prof^a. Dr^a. Livia Godinho Temponi, pelo auxílio na coleta e identificação do material vegetal;

A todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, pelo suporte durante o trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA E ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Lonchocarpus cultratus*

RESUMO

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais são muito importantes, pois podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas. Problemas de saúde pública, como a doença de Chagas e a resistência bacteriana aos antimicrobianos, mostram a necessidade constante na busca de novos medicamentos e princípios ativos mais eficientes e seguros. Neste contexto, o estudo farmacológico de espécies vegetais é de extrema importância. Dentre as plantas com alto potencial medicinal, as do gênero *Lonchocarpus* destacam-se com diversas atividades biológicas relatadas. A planta *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) possui ação comprovada frente ao sarcoma 180 e contra bactérias Gram-positivas. Os principais constituintes químicos identificados são a cordoína, a isocordoína, a derricina e triterpenos. Por ser uma planta pouco estudada e dando continuidade a estudos do grupo de pesquisa, o presente trabalho teve o objetivo de investigar a ação anti-bacteriana dos extratos das sementes e raízes da espécie *L. cultratus*, avaliar a atividade anti-*T. cruzi* e respectiva hemotoxicidade dos extratos das sementes da planta e realizar a caracterização química desses extratos. Os extratos hexânico (LHS), diclorometânico (LDS) e metanólico (LMS) foram obtidos de sementes da planta através de macerações sucessivas. A caracterização química foi realizada por meio de métodos analíticos qualitativos e por RMN ^1H . A atividade anti-bacteriana foi avaliada por teste de difusão em disco, a anti-*T. cruzi* por método de contagem direta dos parasitas em câmara de Neubauer e a hemotoxicidade por método UV. Os testes químicos qualitativos mostraram que alcaloides, chalconas, cumarinas, triterpenos e saponinas estão presentes nas raízes e nas sementes da planta *L. cultratus*, flavonoides e esteroides, somente não foram observados nas raízes e taninos. Chalconas foram identificadas por RMN ^1H , em LDS e LHS e esteróides e terpenos em LMS. Os extratos LDS e LHS apresentaram atividade contra a forma epimastigota do protozoário *T. cruzi*. Os resultados do LDS foram melhores, mostrando inibição de crescimento do protozoário de 92,30% na concentração de $175 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O valor de CI_{50} para este extrato foi $6,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e nesta concentração não apresentou toxicidade para as hemácias. Os extratos estudados não apresentaram atividade antimicrobiana. A ausência de atividade anti-bacteriana nos extratos de *L. cultratus*, principalmente no extrato das raízes cuja propriedade foi reportada anteriormente, sugere problemas relacionados à estabilidade ou baixa concentração de chalconas bioativas no extrato. Embora haja necessidade de pesquisas adicionais, os resultados anti-*T. cruzi* e de hemotoxicidade obtidos com o extrato diclorometânico mostram potencial alternativa para o tratamento da Doença de Chagas.

PALAVRAS CHAVES

Doença de Chagas, Fabaceae, citotoxicidade

ANTI-BACTERIAL AND ANTI-*Trypanosoma cruzi* ACTIVITIES OF SEEDS EXTRACTS FROM *Lonchocarpus cultratus*

ABSTRACT

In the pharmaceutical area, plants and plant extracts are very important because they can serve as prototypes for the development of new drugs and as a source of pharmaceutical raw materials. Public health problems such as Chagas' disease and bacterial resistance to antimicrobials show a constant need for more efficient and safe drugs and active principles. In this context, the pharmacological study of plant species is extremely important. Among the plants with high medicinal potential, those of the genus *Lonchocarpus* stand out with several biological activities reported. The plant *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) has proven action against sarcoma 180 and against Gram-positive bacteria. The main chemical constituents identified are cordoin, isocordoin, derricin and triterpenes. The objective of this study was to investigate the anti-bacterial action of the extracts of the seeds and roots from the *L. cultratus* species, to evaluate the anti-*T. cruzi* activity and the respective hemotoxicity of the extracts of the plant seeds and to carry out the chemical characterization of these extracts. The extracts hexane (LHS), dichloromethane (LDS) and methanolic (LMS) were obtained from plant seeds by successive macerations. The chemical characterization was performed by qualitative analytical methods and by ¹H NMR. The anti-bacterial activity was evaluated by disc diffusion test, anti-*T. Cruzi* by direct counting method of the parasites in the Neubauer chamber and the hemotoxicity by UV method. Qualitative chemical tests showed that alkaloids, chalcones, coumarins, triterpenes and saponins are present in the roots and seeds of *L. cultratus*, flavonoids and steroids, only in the roots and tannins were not observed. Chalcones were identified by ¹H NMR in LDS and LHS and steroids and terpenes in LMS. The LDS and LHS extracts showed activity against the epimastigote form of *T. cruzi* protozoan. The LDS results were better, showing inhibition of protozoan growth of 92.30% at the concentration of 175 µg.mL⁻¹. The IC 50 value for this extract was 6.16 µg.mL⁻¹ and at this concentration did not show toxicity to the red blood cells. The extracts studied did not present antimicrobial activity. The absence of anti-bacterial activity in the extracts of *L. cultratus*, especially in the root extract previously reported, suggests problems related to the stability or low concentration of bioactive chalcones in the extract. Although there is a need for additional research, anti-*T. Cruzi* and hemotoxicity obtained with the dichloromethane extract show an alternative potential for the treatment of Chagas' disease

KEY-WORDS

Chagas disease, Fabaceae, cytotoxicity

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Gênero <i>Lonchocarpus</i>	16
3.2 <i>Lonchocarpus cultratus</i>	21
3.2.1 Estudo fitoquímico de <i>Lonchocarpus cultratus</i>	23
3.2.2 Propriedades farmacológicas de <i>Lonchocarpus cultratus</i>	24
3.2.3 Toxicidade	25
3.3 Doença de Chagas.....	25
3.3.1 Agente Etiológico.....	26
3.3.2 Transmissão da doença.....	27
3.3.2.1 Transmissão vetorial	28
3.3.2.2 Transmissão transfusional.....	28
3.3.2.3 Transmissão vertical.....	29
3.3.2.4 Transmissão por via oral	29
3.3.2.5 Transmissão por acidentes laboratoriais	30
3.3.2.6 Transmissão por transplante de órgãos.....	30
3.3.3 Sintomatologia	30
3.3.4 Tratamento	31
3.4 Atividade antimicrobiana	34
4 REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 1: Artigo científico a ser submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM (Qualis B3).....	42
CAPÍTULO 2: Artigo científico a ser submetido à revista Phytomedicine -International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology (Qualis B1).....	55
5 CONSIDERAÇÕES FINAS	75
ANEXOS.....	76
ANEXO 1: espectros de RMN ¹ H de LHS (500MHz/ CDCl ₃).....	77
ANEXO 2: espectros de RMN ¹ H de LDS (500MHz/ CDCl ₃).....	80
ANEXO 3: espectros de RMN ¹ H de LMS (500MHz/ CDCl ₃)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação Botânica da espécie <i>Lonchocarpus cultratus</i>	23
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da estrutura química básica de flavonóide. Anéis fenólicos (a) e (b), anel pirano (c).	16
Figura 2 Representações das estruturas químicas das principais classes de flavonóides: flavonas (a), flavonóis (b), flavanonas (c), flavanonóis (d), antocianidinas (e), isoflavonas (f) e chalconas (g)	17
Figura 3 Representações das estruturas químicas de lonchocarpina (a), derricina (b), isolonchocarpina (c), isocordoína (d), 4-hidroxi lonchocarpina (e) e cordoína (f). 18	
Figura 4 Representação da estrutura química de 4',5 dimetoxi-(6,7:2'',3'')-6'',6''-dimetilpiranoflavona.	19
Figura 5 Representações das estruturas químicas de longistilina C (a), longistilina D (b), deguelina (c) e tefrosina (d)	21
Figura 6 Foto da planta <i>Lonchocarpus cultratus</i> (a): vista geral da árvore, (b) e (c): galhos, folhas e frutos	22
Figura 7 Representações das estruturas químicas de 2,5- <i>trans</i> -dihidroximetil-3,4- <i>trans</i> -dihidroxipirrolidina (a), 1-deoximannojirimicina (b), 1-deoxinojirimicina (c), fagomina (d) e homonojirimicina (e).	23
Figura 8 Representações das estruturas químicas de chalconas de <i>L. cultratus</i> : dihidrocordoína (a), 4-hidroxiderricina (b), 4-hidroxiisocordoína (c) e 4-hidroxicordoína (d).	24
Figura 9 Morfologia de <i>T. cruzi</i> : (a) epimastigota, (b) tripomastigota e (c) amastigota.	26
Figura 10 Esquema do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 11 Regiões de incidência da Doença de Chagas por transmissão vetorial... 28	
Figura 12 Gráfico geral da resposta humoral (IgG) ao parasita em pacientes com Doença de Chagas	31
Figura 13 Representações das estruturas químicas de Nifurtimox (a) e Benznidazol (b).	32

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana. Ao longo do tempo, os produtos de origem mineral, animal e vegetal foram as principais fontes do arsenal terapêutico.

Apesar dos avanços na medicina, uma parcela grande da população mundial, particularmente a de países em desenvolvimento, ainda utilizam plantas medicinais como cuidado de saúde primário.

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização de produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de substâncias ativas isoladas, como para a obtenção de adjuvantes e fitoterápicos.

Portanto, é evidente que o reino vegetal fornece uma importante fonte de moléculas bioativas e possíveis novos fármacos.

Os diferentes climas, relevos e solos do Brasil favorecem que a flora do seu território seja a mais abundante do mundo. Estima-se que, das espécies vegetais brasileiras, um pequeno percentual já foi avaliado na procura de compostos bioativos.

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, entretanto, fez com que os medicamentos naturais ficassem em segundo plano e fossem substituídos pelos sintéticos. Atualmente, diversos estudos são publicados envolvendo atividade terapêutica de produtos naturais, demonstrando que o interesse por esta área reapareceu. O fato também ocorre porque, além da escassez de princípios ativos com fórmulas novas, grande parte da população mundial, particularmente as de baixa renda, tem dificuldade ao acesso a drogas sintéticas modernas. Um reflexo dessa situação é o crescimento do mercado brasileiro de fitoterápicos nos últimos anos.

Dentre as plantas com alto potencial medicinal, as do gênero *Lonchocarpus* destacam-se com diversas atividades biológicas relatadas como, por exemplo, a atividade antimicrobiana da *Lonchocarpus montanus*. Um levantamento bibliográfico da planta de *Lonchocarpus cultratus*, (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima e respectivos sinônimos, mostrou que a espécie foi pouco estudada e que outras do mesmo gênero apresentam substâncias com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Dentro deste contexto, e dando continuidade aos estudos do grupo de

pesquisas fitoquímicas do Programa de Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, que realizou trabalhos anteriores com extratos de raízes de *Lonchocarpus cultratus*, optou-se por investigar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-bacteriana dos extratos obtidos das sementes desta planta, além de avaliar a citotoxicidade destes extratos, assim como caracterizar seus constituintes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar as atividades anti-bacteriana e anti-*Trypanosoma cruzi* dos extratos de sementes de *Lonchocarpus cultratus*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico das sementes de *L. cultratus*;
- Verificar a presença de atividades anti-bacteriana e anti-*Trypanosoma cruzi* dos extratos obtidos;
- Pesquisar a toxicidade destes extratos frente a hemácias humanas;
- Caracterizar os extratos, através de testes químicos e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gênero *Lonchocarpus*

O gênero *Lonchocarpus* pertence à família *Fabaceae*, à subfamília *Leguminosae*, *Papilionoideae* e constitui-se por cerca de 100 espécies distribuídas na América Latina, África, Madagascar e Austrália (BORGES-ARGÂEZ et al., 2000). No Brasil, foram identificadas 24 espécies nativas (MAGALHÃES et al., 2000).

As plantas do gênero *Lonchocarpus* são conhecidas por apresentarem propriedades inseticidas e pesticidas. Diversas atividades farmacológicas também têm sido relatadas, como por exemplo: a atividade antimicrobiana (MAGALHÃES et al., 2007), a atividade inibitória de células do câncer de próstata, o efeito leishmanicida e a inibição *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* (BORGES et al., 2007).

Estudos fitoquímicos de espécies vegetais têm mostrado que as plantas deste gênero costumam conter flavonóides, metabólitos secundários de valor terapêutico expressivo (BORGES-ARGÂEZ et al., 2000).

Os flavonóides apresentam uma estrutura química básica, marcada por um esqueleto com 15 átomos de carbono distribuídos em três anéis, sendo dois anéis fenólicos (Figura 1a e b) e um anel pirano (Figura 1c). Os flavonóides são classificados dependendo do estado de oxidação do anel pirano (MARÇO et al., 2008) e são divididos em diferentes classes, como as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, antocianidinas, isoflavonas e chalconas (Figura 2) (MACHADO et al., 2008).

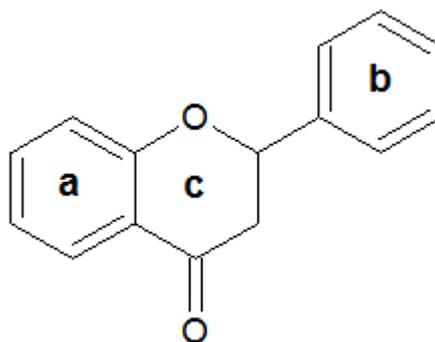


Figura 1 Representação da estrutura química básica de flavonóide. Anéis fenólicos (a) e (b), anel pirano (c)

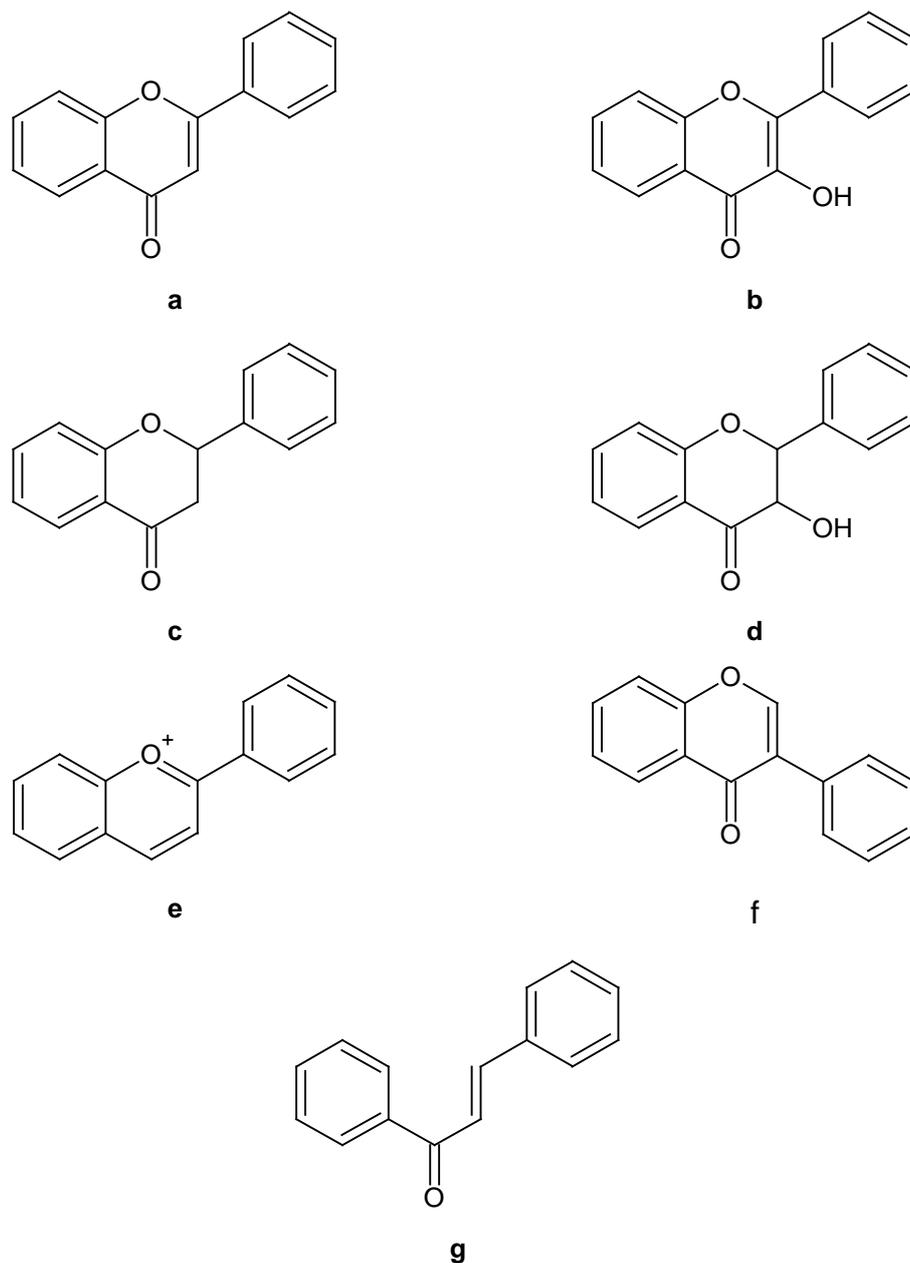


Figura 2 Representações das estruturas químicas das principais classes de flavonóides: flavonas (a), flavonóis (b), flavanonas (c), flavanonóis (d), antocianidinas (e), isoflavonas (f), chalconas (g)

Um exemplo de espécie de *Lonchocarpus* que sintetiza flavonóides é *Lonchocarpus xuul*, um tipo de árvore endêmica da Península de Yucatán, no México. A publicação de Monache et al. (1978) identificou nas sementes da planta três chalconas: lonchocarpina (Figura 3a), derricina (Figura 3b) e 4-hidroxi lonchocarpina (Figura 3e). As cascas do caule também foram estudadas e nelas foram identificados diversos flavonóides (BORGES-ARGÂEZ et al., 2000).

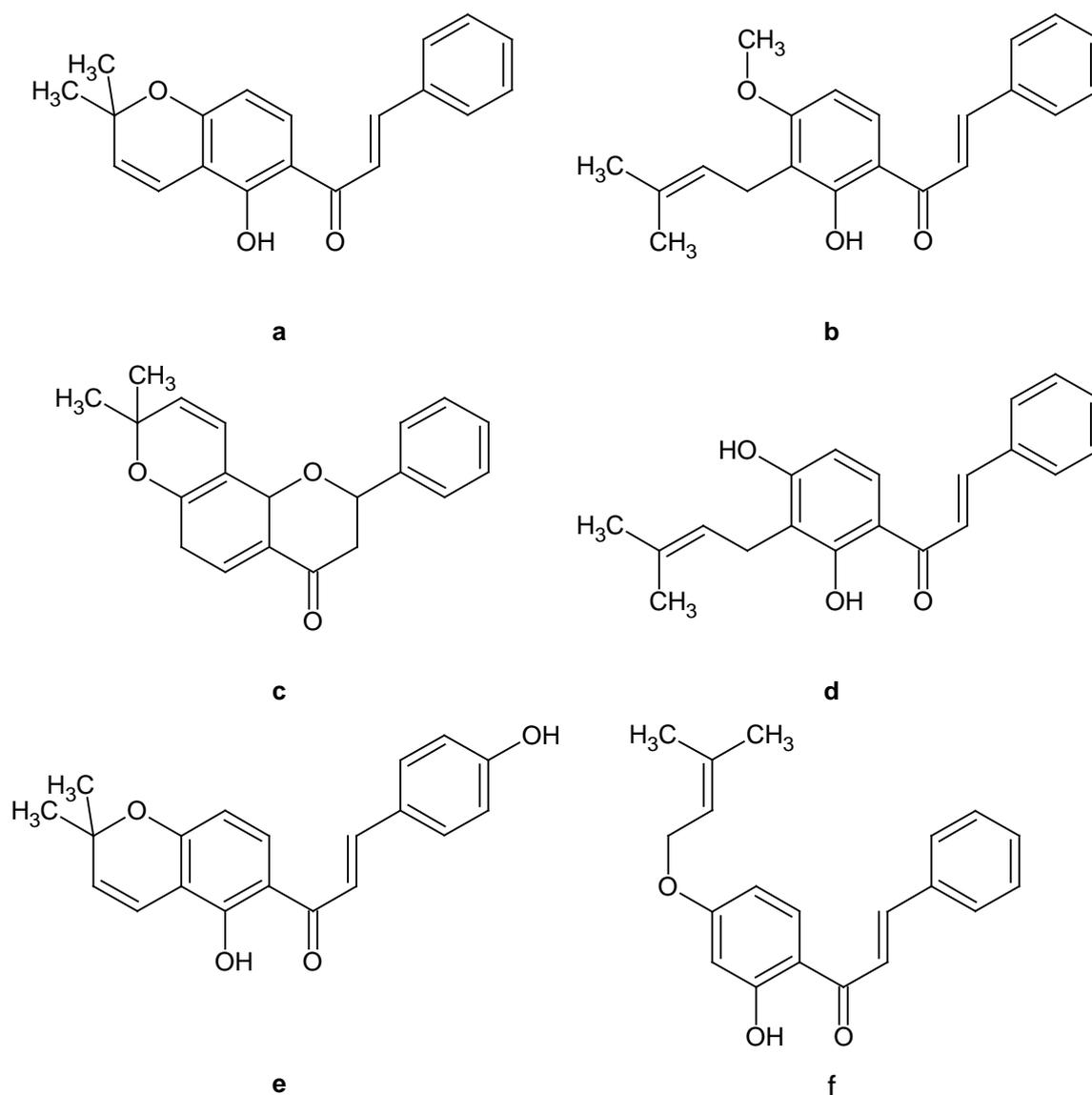


Figura 3 Representações das estruturas químicas de lonchocarpina (a), derricina (b), isolonchocarpina (c), isocordoína (d), 4-hidroxi lonchocarpina (e) e cordoína (f)

Borges-Argaez et al. (2007) isolaram da raiz de *L. xuul* a isocordoína, um tipo de chalcona com atividade leishmanicida e que inibiu a proliferação de células de câncer de próstata (Figura 3d). Estudos posteriores com a isocordoína mostraram atividade tripanocida (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009). O mesmo grupo de pesquisa também isolou das raízes dessa planta a 4',5-dimetoxi-(6,7:2'',3'')-6'',6''-dimetilpiranoflavona (Figura 4) e a lonchocarpina (Figura 3a), avaliando e comprovando a atividade anti-*T. cruzi* de ambas as substâncias (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009). Um potente efeito anti-leishmania também foi verificado em estilbenos isolados do extrato metanólico das folhas e caule de *Lonchocarpus nicou*, planta nativamente peruana conhecida popularmente como “barbasco”. (FUCHINO et al., 2013).

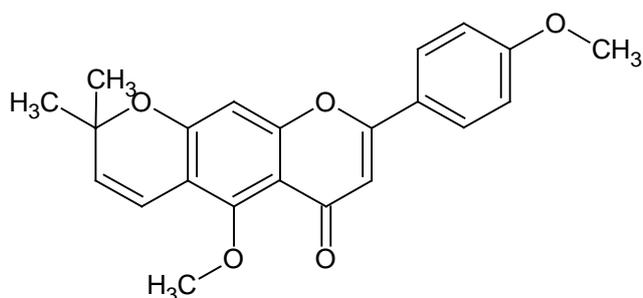


Figura 4 Representação da estrutura química de 4',5 dimetoxi-(6,7:2'',3'')-6'',6''-dimetilpiranoflavona

A di-hidrospinochalcona-A, um novo metabólito isolado das raízes de *L. xuui* apresentou efeito anti-hipertensivo significativo, através de ação direta e relaxante sobre anéis da aorta de ratos (VILLARREAL et al., 2013).

A espécie *Lonchocarpus araripensis* é amplamente distribuída no nordeste brasileiro, onde é conhecida popularmente como 'sucupira'. Estudos fitoquímicos com as sementes desta planta possibilitaram o isolamento da lectina N-acetilglucosamina, um tipo de metabólito com atividade anti-inflamatória (PIRES et al., 2016). A substância 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-(7,8,2'',3'')-cromenoflavona foi isolada das cascas do caule de *L. araripensis* e mostrou duas atividades interessantes: a redução da sensibilidade à dor (nociceptivo) em ratos, sem a alteração na coordenação motora (ALMEIDA et al., 2015) e gastroproteção contra dano da mucosa gástrica (CAMPOS et al., 2008).

A espécie *Lonchocarpus sericeus* é outra planta do gênero *Lonchocarpus*, comum no nordeste brasileiro, onde é conhecida popularmente como 'angelim'. Esta espécie foi estudada fitoquimicamente por Monache et al. (1978), que isolou das sementes os metabólitos secundários lonchocarpina (Figura 3a), derricina (Figura 3b), isolonchocarpina (Figura 3c), isocordoína (Figura 3d), 4-hidroxlonchocarpina (Figura 3e) e cordoína (Figura 3f). Mahmoud e Peter (1986) também estudaram as sementes desta planta e isolaram a flemistrictina-B, um tipo de substância da classe de diidrofuranochalconas. O extrato de sementes de *L. sericeus* mostrou atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (ALENCAR et al., 2005). Neste estudo, verificou-se diminuição da peritonite em camundongos, com acentuada diminuição bacteriana na cavidade peritoneal.

Cunha et al. (2003) reportou que o extrato hexânico das raízes de *L. sericeus* é constituído principalmente por derricina (Figura 3b) e a lonchocarpina (Figura 3a). Estas substâncias, assim como o extrato hexânico das raízes de *L. sericeus*, foram avaliadas frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida Albicans*. Os

resultados do trabalho mostraram que, tanto o extrato como as substâncias isoladas não apresentaram atividade antimicrobiana e nem hemolítica. Entretanto, o extrato e a derricina foram tóxicos para ovos fertilizados de ouriço-do-mar, demonstrando provável potencial antimitótico.

Lonchocarpus montanus é outra espécie do gênero, distribuída pelos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Tocantins. *L. montanus* é conhecida popularmente como "cabelouro" ou "carrancudo" e estudos realizados com o extrato das raízes demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium* e *Rhizopus oryzae* (MAGALHÃES et al., 2007).

A atividade antimicrobiana também foi avaliada com substância derriobtusona A, uma classe de flavonóide isolada das cascas das raízes da planta *Lonchocarpus obtusus* (VASCONCELOS et al., 2014). Este estudo identificou que a substância Derriobtusona A foi eficaz contra *S. aureus*, bem como possui um potencial antioxidante e não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*.

Na espécie *Lonchocarpus chiricanus*, uma classe de árvore nativa do Panamá, as propriedades do extrato diclorometânico das cascas das raízes foram estudadas frente a *Cladosporium cucumerinum*, uma espécie de fungo fitopatogênico, e ao efeito larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Em ambos os testes, foram observados resultados satisfatórios, revelando o potencial farmacológico da planta (IOSET et al., 2001).

As sementes das espécies *L. peninsulares* e *L. unifoliatum* foram estudadas por Monache et al. (1978). No extrato de *L. peninsulares* foram reportados dois estilbenos prenilados: longistilina C (Figura 5a) e longistilina D (Figura 5b). Em *L. unifoliatum*, além de estilbenos, também foram identificados os rotenóides nomeados como deguelina (Figura 5c) e tefrosina (Figura 5d).

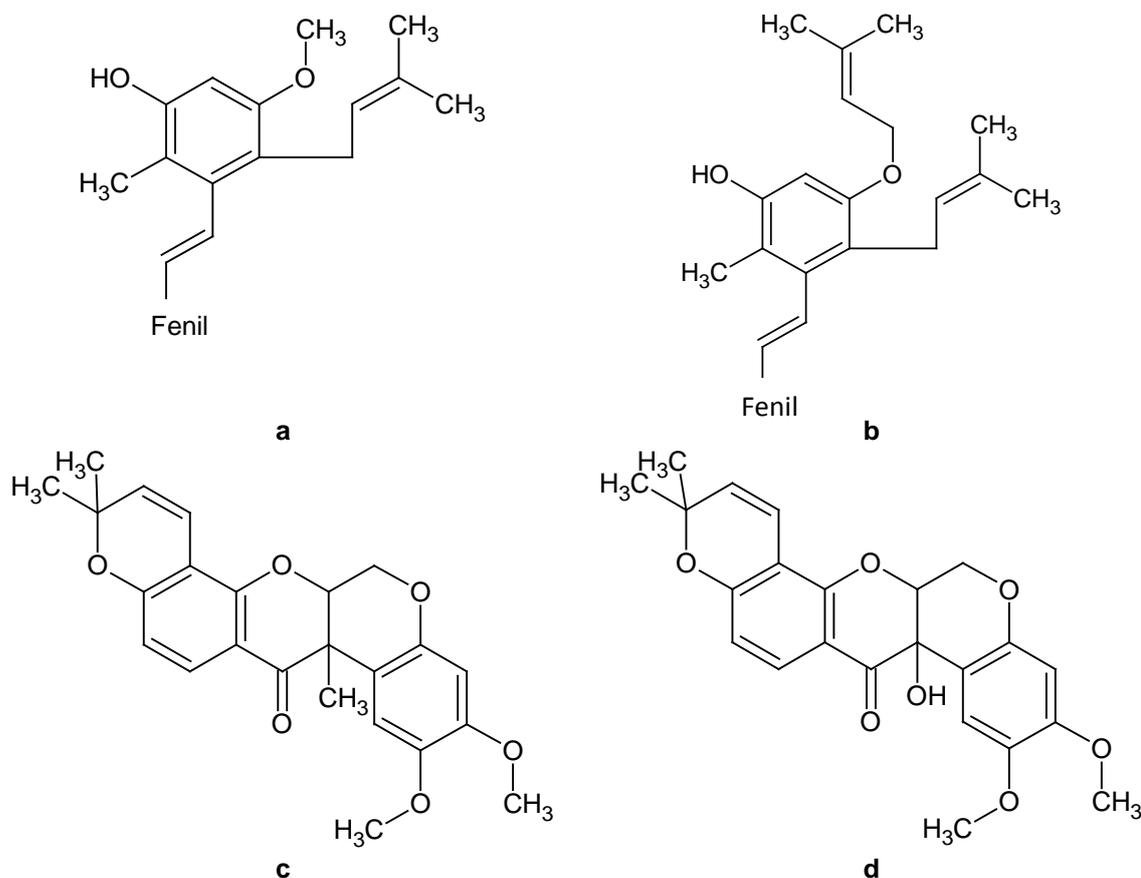


Figura 5 Representações das estruturas químicas de longistilina C (a), longistilina D (b), deguelina (c) e tefrosina (d)

A planta *Lonchocarpus cultratus*, como constituinte do gênero *Lonchocarpus*, merece ser estudada, devido ao potencial farmacológico indicado em outras espécies deste gênero. Desta forma, conhecendo-se a variedade de propriedades apresentadas por vegetais do gênero *Lonchocarpus*, considera-se que o estudo de *L. cultratus* é importante para o desenvolvimento de novos princípios ativos.

3.2 *Lonchocarpus cultratus*

A revisão bibliográfica sobre *L. cultratus* foi realizada nas bases de dados ScinFinder, Science Direct, Scielo Advanced Search, Scopus, Web of Science, Clinical Trials, Cochrane Library, Pubmed, National Agricultural Library e mostrou que há poucas publicações sobre a espécie. Foram encontrados muitos artigos científicos sobre o gênero *Lonchocarpus*, entretanto somente 11 estudos sobre *L. cultratus*, incluindo as respectivas sinonímias, e entre estes, somente um trabalho realizado com extrato das sementes desta planta.

A espécie *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima (Figura 6) pertence à família *Fabaceae* e, talvez porque tenha problemas de taxonomia, apresenta grande variedade de sinónimas, como: *Pterocarpus cultratus*, *Neuroscapha guilleminiana*, *Lonchocarpus neuroscapha*, *Lonchocarpus guilleminianus*, *Derris guilleminiana*, *Neuroscapha pubigera* e *Neuroscapha martiana* (SILVA; TOZZI, 2012).

Popularmente, a planta também é identificada com vários nomes, dependendo da região onde é nativa. No Brasil, é conhecida como: cabelouro, na Bahia; embira-branca, em São Paulo; embira-d'anta e embira-de-macaco, no Espírito Santo; embira-de-carrapato, em Minas Gerais; embira-de-sapo, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal; imbira-de-caboclo, no Paraná; piaca, em Pernambuco e rabo-de-macaco, em Santa Catarina (SILVA; TOZZI, 2012).

L. cultratus é um tipo de árvore que varia de 4 a 30 m de altura, com tronco de 40 – 50 cm de diâmetro. A madeira é moderadamente pesada, dura, compacta, suscetível a polimento e moderadamente resistente ao ataque de organismos xilófagos. Floresce entre dezembro e janeiro e a maturação de seus frutos ocorre durante os meses de maio a agosto (LORENZI, 2002).

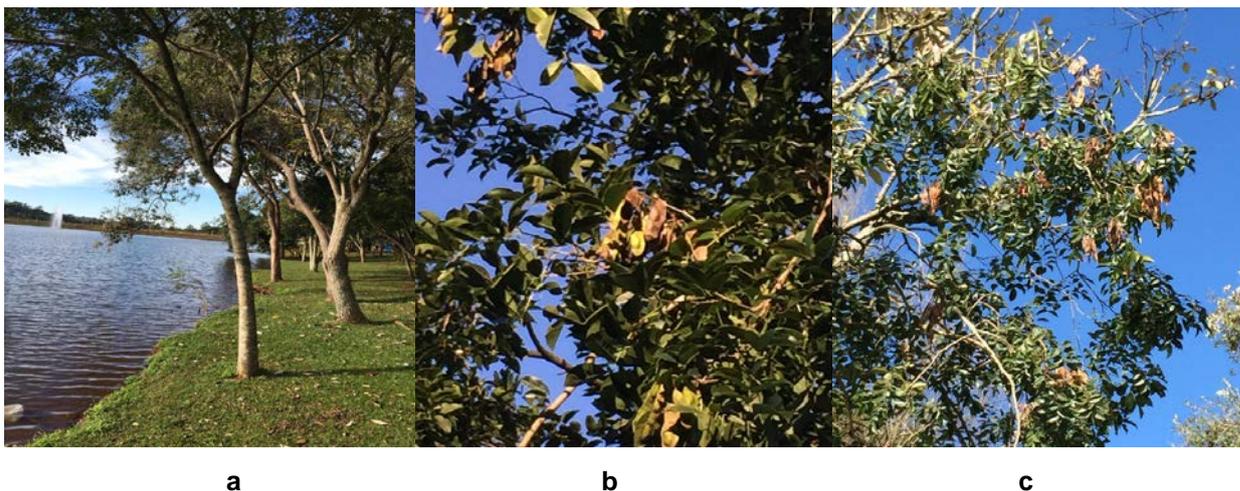


Figura 6 Foto da planta *Lonchocarpus cultratus* (a): vista geral da árvore, (b) e (c): galhos, folhas e frutos. Fonte: autor 2015

A classificação botânica de *Lonchocarpus cultratus* está apresentada na Tabela 1 (SOUZA; LORENZI, 2012).

Tabela 1 Classificação Botânica da espécie *Lonchocarpus cultratus*

Classificação	<i>Lonchocarpus cultratus</i>
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Spermatophyta
Subclasse	Rosidae (Eurosídeas I)
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Faboideae/Papilionoideae
Gênero	<i>Lonchocarpus</i>
Espécie	<i>Lonchocarpus cultratus</i> (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima.

A distribuição desta espécie é restrita à América do Sul, principalmente Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador e Peru. No Brasil, é comum em todas as regiões, especialmente no Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. A árvore de *L. cultratus* cresce usualmente em matas ciliares ou em florestas tropicais sazonalmente secas e úmidas (LORENZI, 2002).

3.2.1 Fitoquímica de *Lonchocarpus cultratus*

A caracterização dos metabólitos secundários de *Lonchocarpus cultratus* não está elucidada, contudo alguns de seus constituintes já foram identificados. Magalhães et al. (2002) observaram no extrato das raízes alcalóides polihidroxiados e derivados acetilados de 2,5-*trans*-dihidroxi-3,4-*trans*-dihidropirrolidina (Figura 7a), 1-deoximannojirimicina (Figura 7b), 1-deoxinojirimicina (Figura 7c), fagomina (Figura 7d) e homonojirimicina (Figura 7e).

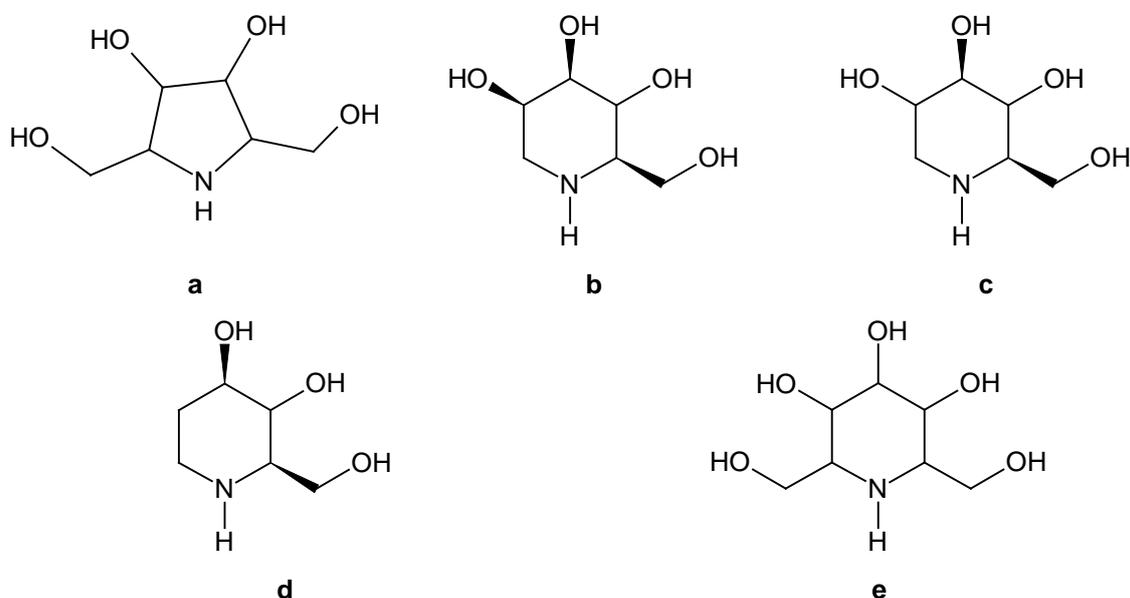


Figura 7 Representações das estruturas químicas de 2,5-*trans*-dihidroxi-3,4-*trans*-dihidropirrolidina (a), 1-deoximannojirimicina (b), 1-deoxinojirimicina (c), fagomina (d) e homonojirimicina (e).

Anteriormente, Mello et al. (1973 e 1974) isolaram nas raízes da planta o triterpeno β -amirina e as chalconas cordoína (Figura 3f), derricina (Figura 3b) e isocordoína (Figura 3d), além de misturas de lonchocarpina (Figura 3a), dihidrocordoína (Figura 8a), isocordoína (Figura 3d), 4-hidroxi lonchocarpina (Figura 3e), 4-hidroxi derricina (Figura 8b), 4-hidroxi isocordoína (Figura 8c) e 4-hidroxi cordoína (Figura 8d).

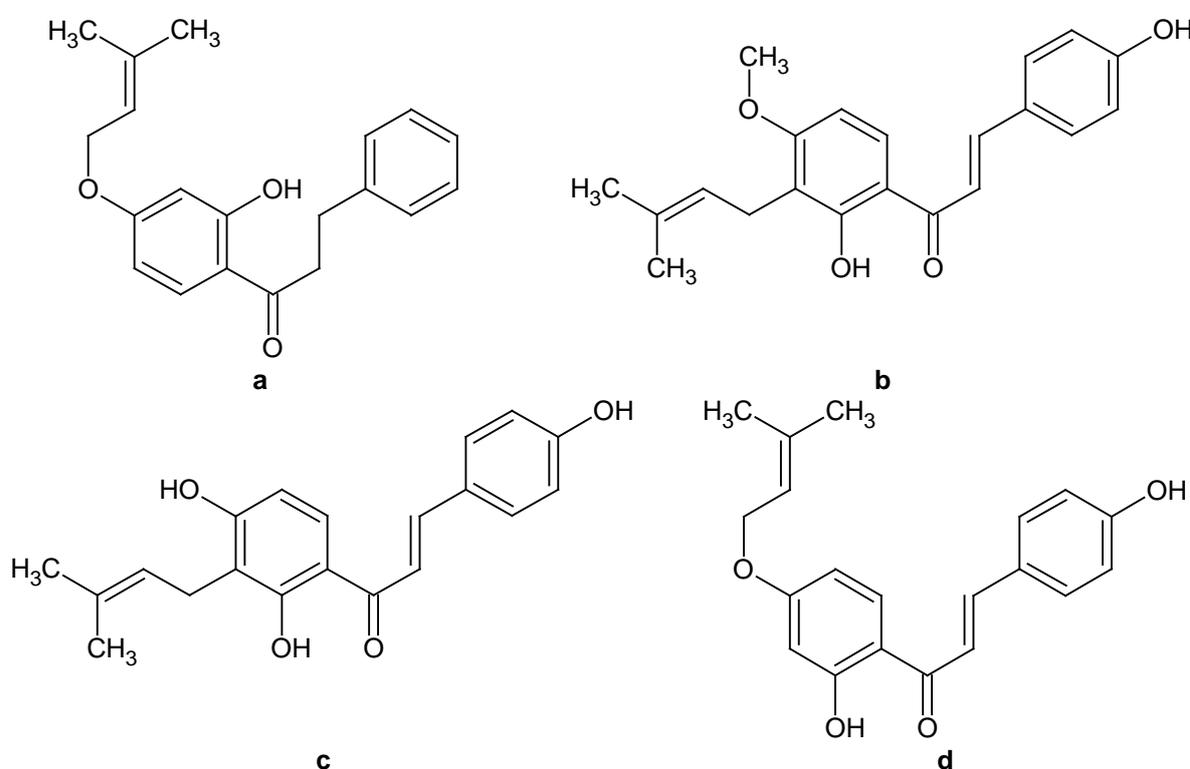


Figura 8 Representações das estruturas químicas de chalconas de *L. cultratus*: dihidrocordoína (a), 4-hidroxi derricina (b), 4-hidroxi isocordoína (c) e 4-hidroxi cordoína (d)

Chalconas preniladas e flavonas também foram isoladas a partir de extratos das sementes desta planta, mostrando que essas substâncias podem estar presentes em outras partes, além das raízes de *L. cultratus* (MENICHINI, 1982).

3.2.2 Propriedades farmacológicas de *Lonchocarpus cultratus*

Testes com células de carcinoma de Ehrlich e de sarcoma 180 foram realizados, utilizando substâncias de *Lonchocarpus cultratus*. Os resultados iniciais foram satisfatórios em relação a inibição destas células cancerígenas (MOREIRA et al., 1973). Um ano após a publicação desses dados, Mello et al. (1974) demonstraram que a cordoína, 4-hidroxi cordoína e 4-hidroxi derricina apresentaram ação inibitória discreta frente a tumores experimentais de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. A derricina também demonstrou atividade antineoplásica apenas frente ao

sarcoma 180. No artigo de Mello et al. (1974), as chalconas preniladas e hidroxiladas 4-hidroxicordoina, 4-hidroxiisocordoina e 4-hidroxiisocordoina, isoladas a partir de extratos da raiz da planta, apresentaram efeito antimicrobiano, frente a vários microrganismos Gram-positivos. Dados semelhantes foram reportados por Roman et al. (2013).

3.2.3 Toxicidade

A toxicidade avalia, entre outras coisas, a concentração na qual uma substância ou um composto, provoca efeito nocivo decorrente da interação da mesma com o organismo, pode também verificar a teratogenia da substância, estimar a atividade antiparasitária e antitumoral da molécula estudada, entre outros.

Um dos métodos utilizados para avaliar a toxicidade é o de letalidade da *Artemia salina* Leach (camarão de salmoura) em contato com uma substância. Este teste mostrou uma boa correlação com atividade antitumoral, tornando-o uma ferramenta de pré-triagem para fármacos anticancerígenos. (PRASHITH et al., 2012).

Magalhães et al. (2002) avaliaram o extrato de *L. cultratus* frente a este método, observaram a existência de toxicidade dos extratos metanólicos das raízes frente a *Artemia salina*, evidenciando a possível ação antitumoral verificada anteriormente por outros autores.

3.3 Doença de Chagas

Um dos acontecimentos médicos mais importantes ocorridos nas Américas foi o descobrimento da Tripanossomíase Americana ou Doença de Chagas (DIAS; COURA, 1997). Esse feito trouxe uma contribuição inovadora ao campo emergente da medicina tropical e dos estudos sobre as doenças parasitárias transmitidas por insetos-vetores, apresentando não apenas uma nova entidade nosológica, mas a realidade sanitária e social do país, assolado pelas endemias rurais. Enaltecida por Oswaldo Cruz como a maior das “glórias de Manguinhos”, a descoberta trouxe imediato prestígio e projeção ao jovem cientista Carlos Chagas (1878-1934), que recebeu várias distinções acadêmicas no Brasil e no exterior, tendo sido indicado ao Prêmio Nobel por duas vezes (KROPF, 2004).

Mais de um século após esta descoberta, mesmo com os avanços no controle da doença em países endêmicos, a enfermidade mantém-se como um processo mórbido e relevante para a saúde pública (OPAS, 2009).

Anualmente, são relatados em média 28000 novos casos nas Américas e destes, 8000 são recém-nascidos. A Doença de Chagas afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo e acarreta, aproximadamente, 12000 mortes anuais. Atualmente, cerca de 65 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença, pois vivem em áreas endêmicas (WHO, 2014).

No Brasil, estima-se que o número de pessoas infectadas por *T. cruzi* variam entre dois a cinco milhões de pessoas (MARTINS-MELO et al., 2014), sendo que entre os anos de 2009 e 2013 foram registrados 23 568 óbitos (DIAS et al., 2016).

3.3.1 Agente Etiológico

O agente causador da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja principal característica estrutural é a presença de um flagelo e ciclo de vida com diversas morfologias, denominadas como: epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 9) (DOCAMPO et al., 1990).

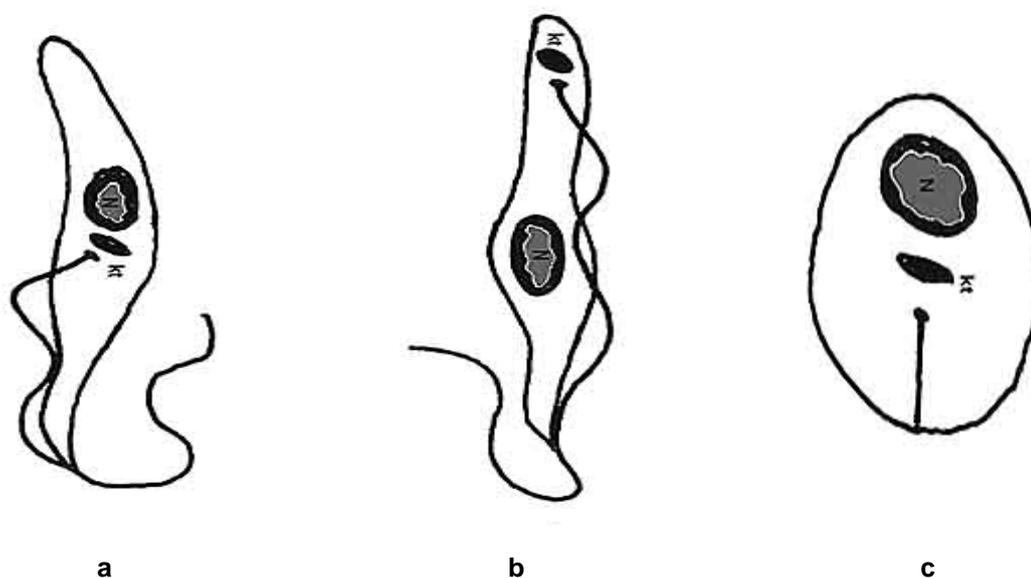


Figura 9 Morfologia de *Trypanosoma cruzi*: (a) epimastigota, (b) tripomastigota e (c) amastigota

Fonte: <http://www.bioscience.org/2003/v8/e/948/fulltext.php?bframe=figures.htm>, Acesso em 30 de novembro de 2016.

A forma epimastigota (Figura 9a) é alongada com flagelo livre. Esta é a forma de replicação no vetor, que se encontra na porção posterior do intestino do inseto e nos meios líquidos de cultura (REY, 2001).

A forma tripomastigota (Figura 9b) também é alongada, entretanto o flagelo se estende por toda a célula e torna-se livre somente na porção anterior. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais celulares, no líquido cefalorraquidiano, leite, espermatozoides e em cultura celulares laboratoriais. As formas

tripomastigotas podem ser diferenciadas em tripomastigotas metacíclicas. Estas formas são morfologicamente semelhantes às tripomastigotas, porém as tripomastigotas metacíclicas são as responsáveis pela infecção, quando liberadas nas fezes do vetor (ARGOLO et al., 2008).

A forma amastigota (Figura 9c) é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. Esta é a forma de replicação nas células do hospedeiro vertebrado e que predomina nas células das fibras musculares estriadas, nas lisas, no sistema fagocítico mononuclear e nos meios de cultura celulares (LANA, 2000).

O ciclo de vida do protozoário *T. cruzi* e as respectivas formas morfológicas celulares estão representados na Figura 10.

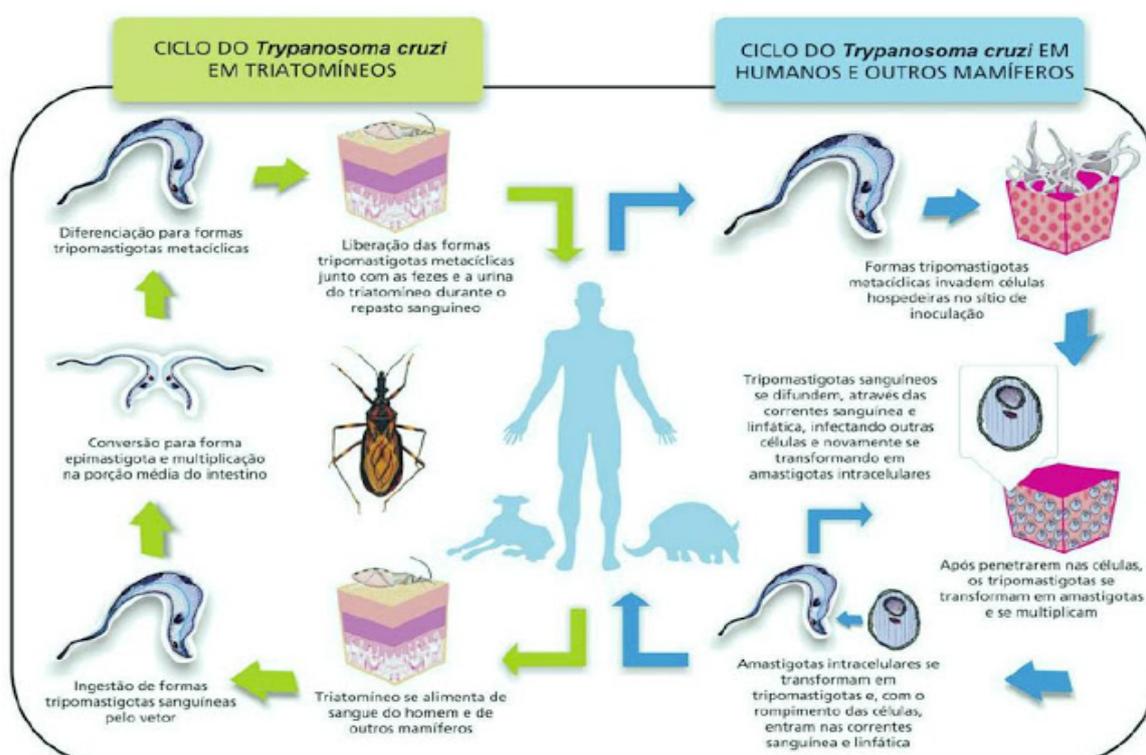


Figura 10 Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: <http://chaguismo.blogspot.com.br/2013/08/trasmisso.html> Acesso em 03 de dezembro de 2016.

3.3.2 Transmissão da doença

As principais formas de transmissão da Doença de Chagas para o homem são: a vetorial, por transfusão de sangue contaminado, a transplacentária (congenita) e pela via oral, através da ingestão de alimentos contaminados por *T. cruzi*. Mecanismos de transmissão menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados e transplante de órgãos (COURA, 2003).

3.3.2.1 Transmissão vetorial

A Doença de Chagas, primitivamente, foi uma enzootia, ou seja, restrita aos reservatórios silvestres. No entanto, a colonização humana neste ambiente acarretou desequilíbrio ambiental, propiciando que a transmissão se difundisse. A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem suscetível com os dejetos dos triatomíneos contaminados, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. Estes insetos defecam após o repasto, eliminando as formas infectantes de *T. cruzi*, que geralmente penetram pelo orifício da picada no ato de coçar (BRENER et al., 2000).

A forma de transmissão vetorial é mais expressiva que as demais e acarreta a endemicidade da doença em 21 países da América Latina (Figura 11).

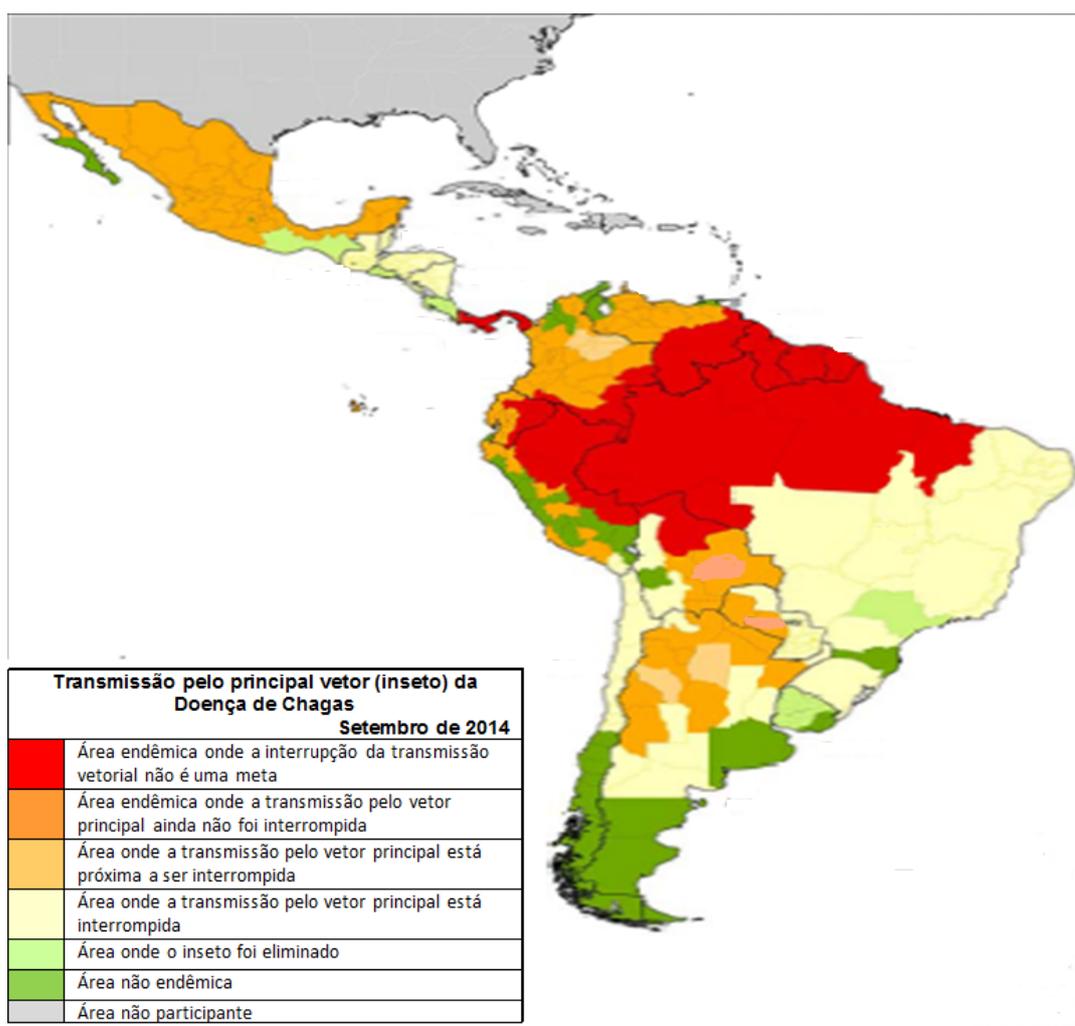


Figura 11 Regiões de incidência da Doença de Chagas por transmissão vetorial
 Fonte: [file:///C:/Users/User/Downloads/Map-int_trans_vector_chagas%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Map-int_trans_vector_chagas%20(3).pdf) Acesso em: 03 de dezembro de 2016.

3.3.2.2 Transmissão transfusional

A transmissão transfusional da Doença de Chagas é uma via importante de propagação da doença nos centros urbanos, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA e outros) e em

países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor (ANGHEBEN et al., 2015).

No Brasil, a prevalência da infecção entre os candidatos a doadores de sangue está em declínio, e permaneceu menor que 0,3% na última década (WHO, 2015). Esses índices refletem a efetividade dos programas de combate ao vetor e maior controle do sangue e hemoderivados, através de uma rigorosa triagem clínica e da doação voluntária de sangue. Também, a atuação mais efetiva da vigilância sanitária sobre os serviços de hemoterapia públicos e privados tem contribuído para o aumento da segurança transfusional e, conseqüentemente, para eliminação da transmissão sanguínea dessa doença (BRASIL, 2009).

3.3.2.3 Transmissão vertical

A principal via da transmissão vertical é a transplacentária, e pode ocorrer em qualquer fase da doença materna: aguda ou crônica. A transmissão também pode se dar em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre, ou ocorrer na passagem no canal do parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (COURA; CASTRO, 2002).

A taxa de transmissão materna para lactentes varia entre 1 e 12% na literatura. Estima-se que haja 4 000 mães infectadas e aproximadamente 200 recém-nascidos susceptíveis de estarem infectados com *T. cruzi* nos EUA e Canadá, anualmente (TRAINA et al., 2016).

3.3.2.4 Transmissão por via oral

A transmissão oral ocorre a partir da ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, principalmente a partir do triatomíneo ou suas dejeções. Pode ocorrer também por meio da ingestão de carne de caça crua ou mal cozida, ou alimentos contaminados por urina ou secreção anal de marsupiais infectados, ou por meio de hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos (BRASIL, 2010).

As fezes de triatomíneos infectados podem permanecer durante algumas horas com potencial infectante em ambientes com elevada umidade. Desta forma, podem contaminar tanto alimentos como patas e aparelho bucal de carreadores secundários, como moscas e baratas. Estudos experimentais mostraram que alimentos como leite ou caldo de cana, na temperatura ambiente, mantém o parasita viável por até 24 horas. Apesar de o suco gástrico dificultar a contaminação, o

protozoário é capaz de transpor a mucosa intestinal mediante mecanismos químicos (DIAS et al., 2016).

O Ministério da Saúde do Brasil contabilizou 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo 35 municípios da Região Amazônica. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles: açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu. A maioria dos surtos ocorreu nos estados do Pará, 75,9% (85 surtos) e Amapá, 12,5% (14 surtos) e, em menor proporção, no Amazonas, 4,5% (5 surtos), Tocantins, 1,8% (2 surtos) e Bahia, 1,8% (2 surtos) (BRASIL, 2015).

3.3.2.5 Transmissão por acidentes laboratoriais

Os acidentes laboratoriais que acarretam a transmissão da Doença de Chagas podem ocorrer devido a contato com culturas de *T. cruzi*, exposição às fezes infectadas ou sangue de humanos ou animais contendo formas tripomastigotas do protozoário (DIAS; NETO, 2011).

3.3.2.6 Transmissão por transplante de órgãos

Nas duas últimas décadas, com o aumento do número de transplantes, essa via de transmissão tem adquirido relevância. A doença de Chagas aguda, que ocorre após um transplante, apresenta-se grave, uma vez que os receptores do paciente estão imunocomprometidos. Os indivíduos infectados apresentam as manifestações clínicas da doença aguda: febre, nódulos cutâneos eritematosos, hepatoesplenomegalia, infadenomegalia, mialgias e cefaléia (BRASIL, 2009).

3.3.3 Sintomatologia

A patologia da doença de Chagas manifesta-se em duas fases: aguda e crônica, podendo ser sintomática ou assintomática. Cerca de 90% dos pacientes são assintomáticos (BRENER et al., 2000).

Depois da infecção e incubação, que na transmissão vetorial pode ser de 1 a 2 semanas, inicia-se a fase aguda da doença. A fase aguda se diferencia da crônica, por ser rápida e com elevada parasitemia (COURA, 2003). Nela, também é possível detectar anticorpos IgM. Gradativamente, há redução da parasitemia e aumento gradual de anticorpos IgG (Figura 12) (BRASIL, 2009).

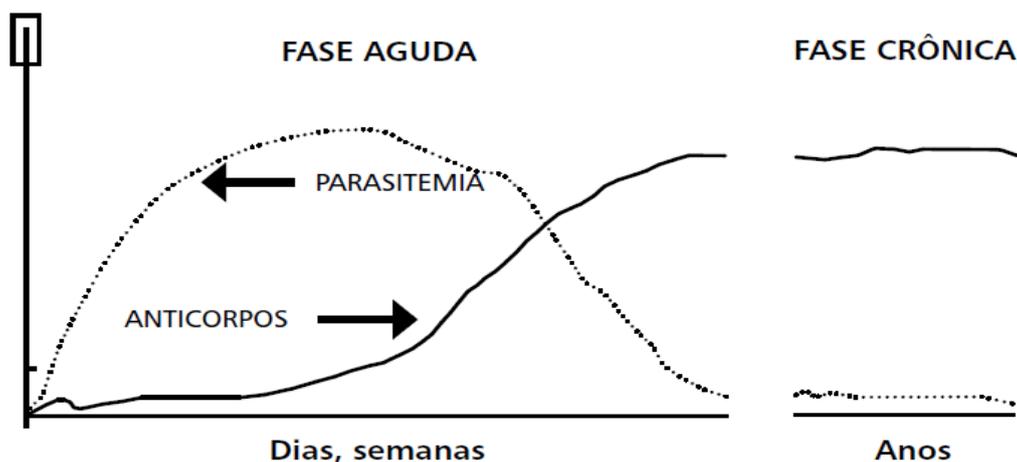


Figura 12 Gráfico geral da resposta humoral (IgG) ao parasita em pacientes com Doença de Chagas
Fonte: BRASIL, 2009.

O quadro agudo é caracterizado por um panorama febril prolongado, cefaléia, artralgia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, *rash* cutâneo e edema. No local da picada do inseto, geralmente observa-se edema cutâneo ou de mucosa, conhecido como “Chagoma de Inoculação” (lesões furunculóides, não supurativas, em membros, tronco e face, por reação inflamatória à penetração do parasita), que quando ocorre nos olhos, denomina-se “Sinal de Romana” (conjuntive unilateral). Nesta fase, os sintomas podem desaparecer espontaneamente, evoluindo para a fase crônica ou, progredindo para formas agudas graves, que podem levar ao óbito (COURA, 2003).

A fase crônica é tardia, com evolução lenta e baixa parasitemia, podendo dividir-se, principalmente, em indeterminada e determinada ou sintomática, podendo apresentar alterações cardíacas, digestivas e mistas (BRENER et al., 2000).

A cardiopatia chagásica crônica é a forma clínica sintomática mais corriqueira da doença de Chagas, ocorre em aproximadamente 20 a 40% das pessoas infectadas, e é uma condição potencialmente letal (FERREIRA et al., 2016).

As lesões cardíacas são primitivamente inflamatórias e, secundariamente degenerativas. As principais manifestações clínicas são a taquicardia, a hipotensão, a arritmia e a cardiomegalia (aumento expressivo do volume do coração) (DIAS et al., 2016).

3.3.4 Tratamento

O tratamento da Doença de Chagas não foi completamente elucidado e tem como objetivo a erradicação da infecção e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento das lesões presentes (COURA et al., 1997).

Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da tripanossomíase americana foram o atoxyl, medicamento derivado de arsênio; a tintura de fucsina; o tártaro emético, uma classe de antimônio pentavalente e o cloreto de mercúrio. Todos estes compostos se mostraram ineficazes no tratamento proposto (COURA; CASTRO, 2002).

Em 1936, um derivado quinolínicó foi empregado pela primeira vez no tratamento da forma aguda da doença de Chagas, mas apresentou discreta atividade parasitária (MAZZA et al., 1937 e OLIVEIRA et al., 2008)

Em 1968, foi realizada uma avaliação meticolosa dos fármacos disponíveis anti-*T. cruzi* em condições *in vitro* e *in vivo*. Com base nos resultados obtidos, 27 compostos e mais de 30 antibióticos foram considerados inativos, e outros apresentaram efeito supressor da parasitemia, porém não se mostraram curativos (BRENER, 1968).

No final dos anos 60 e início dos anos 70, ocorreram fatos animadores para o tratamento da Doença de Chagas, surgindo as drogas Nifurtimox, em 1967 e o Benznidazol, em 1972 - Figura 13 (DIAS; SCHOFIELD, 1999).

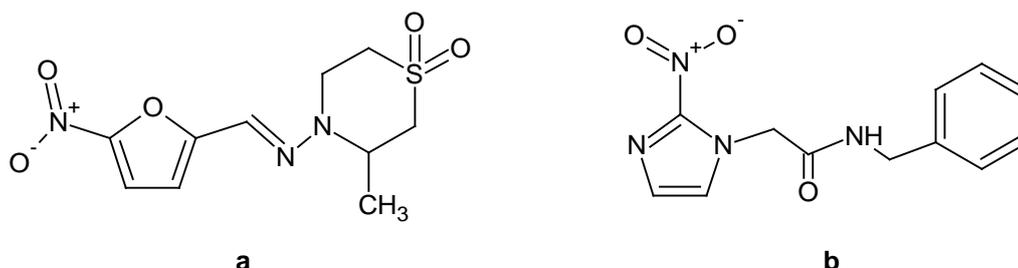


Figura 13 Representações das estruturas químicas de Nifurtimox (a) e Benznidazol (b)

O Nifurtimox (Figura 13a), produzido pelo Laboratório Bayer e lançado com o nome comercial de Lampit[®], foi a primeira droga usada no tratamento da fase aguda da Doença de Chagas (BRENER, 2000). A substância é um tripanocida contra formas amastigotas de *T. cruzi*. O mecanismo de ação no paciente envolve produção de nitrofuranos tóxicos, radicais superóxidos e outras espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. O protozoário é lesado por ser mais sensível a estas substâncias que o hospedeiro (BERNARDES et al., 2006).

Nifurtimox teve a comercialização interrompida na década de 1980, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile, Argentina), devido aos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes em

tratamento (RASSI et al., 2002) e ao surgimento de várias cepas resistentes ao medicamento em regiões endêmicas brasileiras (COURA; CASTRO, 2002).

O Benznidazol (Figura 13b) é uma classe derivada do nitroimidazólico desenvolvido por Wineholt e Liebman, inicialmente produzido pelos Laboratórios Hoffman-La Roche, na Suíça (CANÇADO, 2000). O mecanismo de ação não está elucidado e sabe-se que não ocorre através de reações oxidativas, como o Nifurtimox (URBINA; DOCAMPO, 2003). Os direitos de fabricação do Benznidazol no Brasil foram cedido pela Roche, em abril de 2003. O medicamento tem sido produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), distribuído pela rede pública de postos de saúde e não se encontra disponível em farmácias (SCHOFFIELD et al., 2006).

O Nifurtimox e o Benznidazol apresentam atividade efetiva de 80 – 100% dos pacientes tratados na fase aguda (RASSI et al., 2000). A eficácia pode variar de acordo com a área geográfica do paciente, provavelmente em consequência da susceptibilidade diferente de diversas cepas de *T. cruzi* ao fármaco empregado (DIAS; COURA, 1997).

O uso destes fármacos no tratamento da fase crônica da enfermidade é controverso. Os efeitos colaterais indesejáveis de ambos os medicamentos são os inconvenientes principais. O uso de nifurtimox frequentemente causa anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, e complicações digestivas, como náusea, vômito, cólicas intestinais e diarreia (CASTRO et al., 2006).

No tratamento com benznidazol, as reações adversas mais evidentes são as cutâneas, como hipersensibilidade, dermatite com erupções, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular (CASTRO et al., 2006).

Outros medicamentos também foram testados contra o protozoário *T. cruzi*, dentre eles Alopurinol (GIANELLA et al., 1997 e RASSI et al., 2007), Cetoconazol (BRENER, 1993), Ravuconazol, Megazol e os derivados Naftoimidazólicos, porém nenhum apresentou resultados eficientes na terapêutica da Doença de Chagas (OLIVEIRA et al., 2008).

Há muito tempo, as plantas medicinais são utilizadas no tratamento de doenças parasitárias pela medicina popular e, muitos trabalhos corroboram a importância terapêutica de produtos naturais na tripanossomíase americana (BEZERRA et al., 2012). Substâncias de origem natural de diversas classes, como, por exemplo, quinonas, flavonóides, alcalóides e terpenos podem ser ativos contra

T. cruzi e se apresentam como uma direção promissora na busca de drogas eficazes para prevenção e tratamento da doença de Chagas (GUIMARÃES et al., 2007).

3.4 Atividade antimicrobiana

Atualmente, a frequência de doenças infecciosas e o uso indiscriminado de terapia antimicrobiana criaram uma situação problemática, originando bactérias resistentes a múltiplas drogas. O fato representa ameaça e fonte de preocupação mundial, porque remete à condição provável de ausência futura de medicamentos antimicrobianos.

Os microrganismos têm mostrado enorme capacidade de evoluir em direção a resistência aos antibióticos (GONZÁLEZ-ZORN; ESCUDERO, 2012). A escolha destas drogas em terapias antimicrobianas, na maior parte dos casos, é feita de forma empírica, baseada no tipo de infecção e não propriamente no microrganismo infectante e respectivo perfil de sensibilidade (AMOROSO, 2002).

O assunto tem sido amplamente discutido nos meios hospitalares e em áreas afins, provocando a formação de comissões, cujo objetivo é discutir procedimentos apropriados de utilização de antibióticos, especialmente, diminuir o desenvolvimento de populações de microrganismos resistentes, preservar o espectro de atividade dos antimicrobianos atuais e evitar as consequências do desaparecimento gradual da atividade antimicrobiana no tratamento das infecções.

A comunidade científica e a indústria farmacêutica, frente a magnitude do problema e paralelamente às boas práticas de utilização e emprego de antimicrobianos, responderam com elaboração e realização de inúmeros projetos, empregando moléculas de antimicrobianos modificadas, estudos de atividade relacionados à estrutura química e síntese de novas substâncias.

Apesar da realização destes trabalhos, a produção de novos fármacos antimicrobianos vem declinando nos últimos 20 anos (CECHINEL FILHO, 2012) e, neste contexto, a biodiversidade da flora brasileira é um componente essencial na descoberta de novos fármacos.

No Brasil, os estudos sobre medicamentos antimicrobianos de origem vegetal tiveram impulso, a partir de trabalhos de Gonçalves de Lima (1959) e outros pesquisadores. Assim, grande número de plantas da flora brasileira tem sido utilizado na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos para tratar infecções. As publicações destes estudos vêm demonstrando o potencial farmacológico da área.

Assim, conhecendo o potencial farmacológico das plantas constituintes do

gênero *Lonchocarpus*, especialmente as atividades tripanocida e antimicrobiana; sabendo da carência de estudos sobre *L. cultratus*, da existência da problemática relacionada à resistência microbiana e das dificuldades com o tratamento dos portadores da Doença de Chagas, o presente trabalho foi realizado sobre as atividades anti-*T. cruzi*, antimicrobiana e de toxicidade de extratos de sementes desta planta.

4 REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K. B.; ARAGÃO, K. S.; ASSREUY, A. M. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; CAVADA, B. S.; VALEET, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.919-922, 2005.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, J. C.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SOUZA, G. R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R.; QUEIROZ, D. B.; BOTELHO, M. A. 3,6-Dimethoxy-6",6"-Dimethyl-(7,8,2",3")- Chromeneflavone, a Flavonoid Isolated from *Lonchocarpus Araripensis* Benth. (Fabaceae), Reduces Nociceptive Behaviour in Mice. **Phytotherapy Research**, v.29, p.1622–1627, 2015.
- AMOROSO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT. Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.16, p.189-203, 2002.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D.; GOBBI, F.; BISOFFI, Z.; PUPELLA, S.; GANDINI, G.; APRILI, G. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfus**, v.13, p.540-50, 2015.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil**, 1 ed. Rio de Janeiro:Imperial Novo Milênio, 2008.
- BERNARDES, L. S.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4- bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorg Med Chem**, v.14, n.21, p.7075-82, 2006.
- BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v.38, n.1, 2012.
- BORGES-ARGAEZ, R.; PEÑA-RODRÍGRUES, L. M.; WATERMAN, P. G. Flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus xuul*. **Phytochemistry**, v.54, p.611-614, 2000.
- BORGES-ARGAEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMENEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus spp*. **Phytomedicine**, v.14, p.530-533, 2007.
- BORGES-ARGAEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. **Planta Medica**, v.75, n.12, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 7ª edição. Brasília. DF, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso**, 8ª edição, Brasília. DF, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, v.46, n.21, p.1-9, 2015.

BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: CANÇADO, J. R. **Doença de Chagas**, Belo Horizonte: Imp. Of. de Minas Gerais, 1968.

BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; GALVÃO, L. M.; LUZ, Z.M.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, L.M.; CANÇADO, C.B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.88, 1993.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CAMPOS, D. A.; LIMA, A. F.; RIBEIRO, S. R. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, p.391–397, 2008.

CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In: Brener Z, Andadre ZA, Barral-Neto M (Eds). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum. Exp. Toxicol**, n.25, 2006.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. **Química de Produtos Naturais – Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**, Itajai: Ed. Univali, p.21, 2012.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.30, n.2, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, 2002.

COURA, J. R.; Tripanosomose, Doença de Chagas. **Ciência e cultura**, v.55 n.1, São Paulo, 2003

CUNHA, G. M. A.; FONTENELE, J. B.; NOBRE, H. V. J.; SOUSA, F. C. M.; SILVEIRA, E. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; MORAES, M. O.; VIANA, G. S. B.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic Activity of Chalcones Isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. **Phytotherapy Research**, v.17, p.155–159, 2003.

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.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J.; The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94 suppl. I, 1999.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *trypanosoma cruzi* no Brasil. **História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v.44, Suplemento II, 2011.

DIAS, J. C. P.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; TORRES, R. M.; MELO, J. R. C.; ALMEIDA, E. A.; OLIVEIRA, W. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, n.25, p.7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; CLÁUDIO, L. D. G.; LIMA, M. M.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; SILVA, R. A.; ALVES, R. V.; COSTA, V. M. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. **Epidemiol. Serv. Saude**, n.25, p.87-90, 2016.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v.73, n.1, 1990.

FERREIRA, A. M.; SABINO, E. C.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, C. D. L.; CARDOSO, C. S.; RIBEIRO, A. L. P.; HAIKAL, D. S. Benznidazole Use among Patients with Chronic Chagas' Cardiomyopathy in an Endemic Region of Brazil. **PLoS ONE**, v.11, n.11, p.1-13, 2016.

FUCHINO, H.; KIUCHI, F.; YAMANAKA, A.; OBU, A.; WADA, H.; MORIYASUMOTO, K.; KAWAHARA, N.; FLORES, D.; PALACIOS, O.; SEKITA, S.; SATAKEG, M. New Leishmanicidal Stilbenes from a Peruvian Folk Medicine, *Lonchocarpus nicou*. **Chem. Pharm. Bull**, v.61, n.9, p.979–982, 2013.

GIANELLA, A.; HOLZMAN, A.; LIOSH, N.; BARJA, Z. Y.; PEREDO, C. Eficácia del alopurinol en la enfermedad de Chagas crônica. Resultados del estudio realizado en Santa Cruz, Bolivia. **Bol Cientif Cenetrop**, v.16, 1997.

GONZÁLEZ-ZORN, B.; ESCUDERO, J.A. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. **Int Microbiol**, v.15, n.3, p.101-9, 2012.

GONÇALVES DE LIMA, O. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de antibióticos em madeiras de lei do Brasil. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.2, p.19-33, 1959.

GUIMARÃES, D. A. S.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, 2007.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Five New Prenylated Stilbenes from the Root Bark of *Lonchocarpus chiricanus*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.710-715, 2001.

KROPF, S. P. **História da doença de Chagas: ciência, saúde e sociedade**. Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://chaguismo.blogspot.com.br/2013/08/historia-da-doenca-de-chagas-ciencia.html>. Acesso em: 30 de novembro de 2016.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, ed.10, Sao Paulo: Atheneu, 2000.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v.01, ed.4. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; QUEIROZ, S. C. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.787-92, 2000.

MAGALHÃES, A. F.; SANTOS, C. C.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A. Detection of polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* extracts by GC-MS of acetylated derivatives. **Phytochem. Anal.**, v.13, 2002.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. D. P. C.; PEREZ, M. A. F. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.79, n.3, p.351-367, 2007.

MAHMOUD, E. N.; PETER, G. W. Flemistrictin-B: a chalcone from the seeds of *lonchocarpus sericeus*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, 1986.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1218-1223, 2008

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCARA, C. H.; HEUKELBACHA, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: Asystematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.130, p.67–174, 2014.

MAZZA, S.; CÁSSIO, R.; ZUCARDI, E. L. Primer caso agudo de enfermedad de Chagas comprobado em Tucumán y su tratamiento com Bayer 7602. **Misión de Estudios de Patologia Regional (MEPRA)**, v.32, 1937.

MELLO, J. F.; MONACHE, F. D.; LIMA, O. G.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MONACCHE, D. G.; LYRA, F. D. A.; ALBURQUERQUE, M. M. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L. 4'-Hidroxi-2'-y, y-Dimetilaliloxi-chalcona e seus derivados naturais de *Lonchocarpus neuroscapha* Bentham (*Cordia Piaca*). **Revista do Instituto de Antibioticos da Universidade Federal de Pernambuco**, v.13, n.1-2, 1973.

MELLO, J. F. LIMA, O. G.; ALBUQUERQUE, M. M. F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; LYRA, F. D. A.; SILVA, E. C. S.; BARRON, J. S.; OLVEIRA, E.L. O- and C-Prenylated chalcones with antibiotic and antineoplastic activity isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. **Revista do Instituto de Antibioticos da Universidade Federal de Pernambuco**, v.14, n.1-2, 1974.

MENICHINI, F.; MONACHE, D. F.; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids and rotenoids from Tephrosieae and related tribes of leguminosae. **Planta medica**, v.45, n.4, 1982.

MONACHE, F. D.; SUAREZ, L. E.; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids from the seeds of six Lonchocarpus species. **Phytochemistry**, v.17, 1978.

MOREIRA, L. C.; SANTANA, C. F.; SILVA, I. N. In vitro study of the antineoplastic action of substances of microbial and plant origin against Ehrlich and sarcoma 180 carcinomas. **Revista do Instituto de Antibioticos da Universidade Federal de Pernambuco**, v.13, n.1-2, 1973.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA, A. S. J.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. **Revista de patologia tropical**, v.37, n.3, p.209-228, 2008.

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. 2009. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1335550488_Guia%20Para%20Vigil%C3%A2ncia,%20Preven%C3%A7%C3%A3o,%20Controle%20e%20Manejo.pdf Acesso em: 30 de novembro de 2016.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SOARES, P. M. G.; RIBEIRO, R. A.; ARAGÃO, K. S.; MARINHO, M. M.; SILVA, M. T. L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of Lonchocarpus araripensis attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**, v.65, p.43-52, 2016.

PRASHITH, K. T. R.; RAGHAVENDRA, H. L.; VINAYAKA, K. S. Cytotoxic Activity of *Croton gibsonianus* Nimm. Grah. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v.1, p.57-59, 2012.

RASSI, J. A.; MARIN-NETO, J. A. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. **Rev Soc Cardiol São Paulo**, v.10, 2000.

RASSI, A.; AMATONETO, V.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI-FILHO, F.; AMATO, V. S.; RASSI, G. G.; RASSI, J. A. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado a corticóide. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, 2002.

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. J. R.; RASSI, G. G.; RASSI, S. G.; DA SILVA, I. G.; RASSI, A. G. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, 2007.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Americas e na Africa. Ed.3, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROMAN, B. I.; HEUGEBAERT, T. S.; BRACKE, M. E.; STEVENS, C. V. Assessment of the Antineoplastic Potential of Chalcones in Animal Models. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n.2, p.186-221, 2013.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v.22, 2006.

SILVA, M. J.; TOZZI, A. M. G. A. Revisão Taxonômica de *Lonchocarpus* s. str (Leguminosae, Papilionoideae) do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v.26, n.2, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Ed.3, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

TRAINA, M.; MEYMANDI, S.; BRADFIELD, J. S. Heart Failure Secondary to Chagas Disease: an Emerging Problem in Non-endemic Areas. **Current Heart Failure Reports**, 2016.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v.19, 2003.

VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; ALENCAR, D. B.; SAKER-SAMPAIO, S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; CAVADA, B. S.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O.; TEIXEIRA, E. H. Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated from *Lonchocarpus obtusus*. **BioMed Research International**, p.1-9, 2014.

VILLARREAL, A. G.; HERNÁNDEZ-ABREU, O.; HIDALGO-FIGUEROA, S.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; ESCALANTE-EROS, F.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-Aisolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production:Computational and ex vivo approaches. **Phytomedicine**, v.20, p.1241–1246, 2013.

WHO - World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v.90 n.6, p.33-44, 2015.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. 2014. **Chagas disease** (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

Capítulo 1

**Artigo científico a ser submetido à revista Revista Brasileira de Plantas
Medicinais - RBPM (Qualis B3)**

**Avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos de raízes e de sementes de
Lonchocarpus cultratus (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima**

GRIEBLER, A.¹; BORTOLUZZI, A.A.M.¹; ALMEIDA, A.²; OLIVEIRA, I.V.²; SIQUEIRA, L.V.²; SANTOS, L.H.³; JORGE, M.M.³; SILVA, E.A.A.⁴; MACHADO, N.C.L.⁵; GIOPPO, N.M.R.⁵; JORGE, T.C.M.^{1*}

¹PCF-Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNIOESTE. ² Colegiado do Curso de Farmácia, UNIOESTE, ³Colegiado do Curso de Medicina, UNIOESTE, ⁴Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE, ⁵HUOP-Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da UNIOESTE. UNIOESTE-Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, *Campus* Universitário, Cascavel, PR, CEP: 85 819-110, Brasil. *Autor para correspondência: tereza.jorge@unioeste.br

RESUMO

Os antimicrobianos são instrumentos valiosos para o controle das infecções e restabelecimento da saúde, contudo, a terapia com antibióticos passou a ser frequente e irrestrita. Esse fato foi uma das causas principais do surgimento de cepas resistentes, cenário preocupante e cada vez mais grave. Para minimizar esse problema, diversas ações foram tomadas, entre elas, o descobrimento de novos antimicrobianos. Vários medicamentos foram desenvolvidos baseados em plantas. O gênero *Lonchocarpus* (*Fabaceae*) possuiu espécies com comprovada ação antimicrobiana, dentre elas, a *Lonchocarpus cultratus*. Estudos mostraram efeitos antibióticos de chalconas isoladas das raízes dessa planta, contudo, outras partes da mesma não foram avaliadas. Devido a este contexto, o objetivo deste trabalho é

investigar a atividade antimicrobiana dos extratos de raízes e de sementes de *L. cultratus*, além de caracterizar os constituintes por testes químicos. Os extratos foram obtidos das sementes e raízes da planta através de macerações sucessivas. A caracterização foi obtida por meio de métodos analíticos qualitativos, para verificar a presença de chalconas, saponinas, esteroides, triterpenóides, alcaloides, taninos, cumarinas, e flavonoides. A atividade anti-bacteriana foi avaliada por teste de difusão em disco frente às cepas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os testes químicos mostraram que alcaloides, chalconas, cumarinas, triterpenos e saponinas estão presentes nas raízes e nas sementes; flavonoides e esteroides, somente nas raízes, e taninos não foram observados. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias estudadas. Concluimos que a ausência de atividade antimicrobiana nos extratos de *L. cultratus*, principalmente no extrato das raízes cuja propriedade foi reportada anteriormente, sugere problemas relacionados à estabilidade ou baixa concentração de chalconas bioativas no extrato.

Palavras chaves: Antibiótico, Fabaceae, embira de caboclo.

ABSTRACT

Anti-bacterial activity of extracts of roots and seeds from *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima

Antimicrobials are valuable tools for controlling infections and restoring health, but antibiotic therapy has become frequent and unrestricted. This fact was one of the main causes of the emergence of resistant strains, a worrying and increasingly serious scenario. To minimize this problem several actions were taken, among them the discovery of new antimicrobials. Several drugs have been developed based on

plants. The genus *Lonchocarpus* (Fabaceae) has species with proven antimicrobial action, among them *Lonchocarpus cultratus*. Studies have shown antibiotic effects of chalcones isolated from the roots of this plant, but other parts of it have not been evaluated. Due to this context, the objective of this work is to investigate the antimicrobial activity of root and seeds extracts from *L. cultratus*, besides characterizing the constituents by chemical tests. The extracts were obtained from the seeds and roots of the plant through successive macerations. The characterization was obtained through qualitative analytical methods to verify the presence of chalcones, saponins, steroids, triterpenoids, alkaloids, tannins, coumarins, and flavonoids. The antimicrobiological activity was evaluated by disc diffusion test against strains: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Chemical tests showed that alkaloids, chalcones, coumarins, triterpenes and saponins are present in roots and seeds; flavonoids and steroids, only in the roots and tannins were not observed. The extracts did not present antimicrobial activity against the studied bacteria. We conclude that the absence of antimicrobial activity in the extracts of *L. cultratus*, especially in the root extract previously reported, suggests problems related to the stability or low concentration of bioactive chalcones in the extract.

Key words: Antibiotic, Fabaceae, embira de caboclo.

INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana irrestrita foi uma das causas principais do surgimento de cepas de organismos resistentes. Os insetos, fungos e bactérias apresentam um tipo de metabolismo que, ao longo do tempo, foi capaz de desenvolver mecanismos de sobrevivência. O advento dos agrotóxicos, por exemplo, cujo objetivo foi

umentar a produtividade das lavouras, fez surgir classes de insetos resistentes, que inicialmente, exigiam aplicação de quantidades cada vez maiores de agrotóxico, para se tornarem sensíveis somente a outros tipos destas substâncias. Da mesma forma, a descoberta dos antimicrobianos disponibilizou um instrumento valioso para o controle das infecções e restabelecimento da saúde. Assim, a terapia com antibióticos passou a ser excessivamente frequente.

O aspecto comum entre o uso dos agrotóxicos na lavoura ou o da administração dos antibióticos no tratamento das infecções é a exposição da substância frente ao inseto, parasita ou microorganismo. Se não houvesse exposição, não haveria desenvolvimento de resistência. Entretanto, impedir o uso de agrotóxicos ou de antibióticos é impraticável. Assim, uma das opções da indústria química foi produzir substâncias menos estáveis, que se degradam facilmente no ambiente, disponibilizando menor tempo de exposição frente ao inseto, dificultando o desenvolvimento de resistência e, também causando menor poluição ambiental. No âmbito das comissões de saúde, procurou-se preservar a atividade dos antimicrobianos, limitando a exposição ao microorganismo, de forma que as terapias antimicrobianas não fossem empregadas indiscriminadamente. A indústria farmacêutica respondeu com a elaboração de diversos projetos de pesquisa na área: modificando as moléculas bioativas existentes, realizando estudos de atividade relacionada à estrutura química e propondo novas drogas ativas.

Apesar da realização de todos estes trabalhos, a produção de novos fármacos antimicrobianos vem declinando nos últimos 20 anos (Cechinel Filho, 2012). A descoberta de antimicrobianos novos, especialmente em medicina e farmácia, continua sendo relevante. A moderna farmacognosia, por exemplo, preconiza como as plantas e os fungos foram capazes de desenvolver metabólitos secundários bioativos. Estas substâncias foram sendo produzidas em milhares de

anos de evolução, através da seleção natural das espécies frente a diferentes agressores. Aos químicos de produtos naturais e farmacêuticos restou a responsabilidade da investigação e identificação destas substâncias.

Neste contexto, a biodiversidade brasileira é essencial para auxiliar a descoberta de novos fármacos. A flora brasileira é constituída por muitas espécies vegetais, capazes de produzir milhares de metabólitos secundários que, de alguma forma estão envolvidos com a sobrevivência dos vegetais.

Na literatura científica, há registros, por exemplo, de 34 espécies de plantas do gênero *Lonchocarpus* (*Fabaceae*), conhecidas por apresentarem metabólitos secundários potencialmente bioativos (Magalhães et al., 2000). Entre eles, destaca-se o trabalho de Alencar et al. (2005), que reportaram atividade anti-inflamatória e antimicrobiana em extrato de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, mostrando redução da peritonite em camundongos, acompanhada de acentuada diminuição bacteriana na cavidade peritoneal destes animais. Estudos com o extrato obtido de raízes de *Lonchocarpus montanus* também apresentaram atividade antimicrobiana (Magalhães et al., 2007) e, a derriobtusona A, metabólito da classe dos flavonóides, isolada das raízes de *Lonchocarpus obtusus* por Vasconcelos et al. (2014), mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, um tipo de bactéria importante em quadros infecciosos.

Um levantamento bibliográfico sobre a espécie *Lonchocarpus cultratus* (Vell.), A.M.G. Azevedo & H.C. Lima, revelou poucos registros de estudos químicos e de bioensaios sobre esta planta. Mello et al. (1974) mostraram 4 chalconas (4-hidroxiderricina, 4-hidroxilonchocarpina, 4-hidroxisocordoína e 4-hidroxicordoína) isoladas de extratos da raiz de *Lonchocarpus neuroscapha* (sinonímia para *L. cultratus*), que apresentaram atividade antimicrobiana. Chalconas preniladas semelhantes também foram isoladas de extratos de sementes de *L. cultratus*,

mostrando que estas substâncias estão presentes em outras partes da planta, além das raízes (Menichini, 1982).

Assim, considerando as propriedades biológicas dos metabólitos secundários dos vegetais do gênero *Lonchocarpus* e a escassez de informações sobre *L. cultratus*, observando que uma árvore cresce às margens do Lago Municipal de Cascavel-PR, demos prosseguimento aos estudos com extratos obtidos desta espécie vegetal e, organizamos este projeto, cujo objetivo é investigar a atividade antimicrobiana dos extratos de raízes e de sementes de *L. cultratus*, além de caracterizar os extratos obtidos por testes químicos, que revelam a presença das principais classes de metabólitos secundários presentes nestes extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi obtido da árvore localizada às margens do Lago do Parque Municipal de Cascavel-PR, Brasil (S 24.96308° e O 53.43674°). Amostras de raízes foram coletadas em abril de 2014 e as sementes, em maio de 2015. Folhas e galhos, também foram colhidos nas duas ocasiões para confecção de exsiccatas, depositadas no Herbário da UNIOESTE: UNOP n^o. 20 (coleta de raízes) e UNOP n^o. 1889 (coleta de sementes). A planta foi identificada como *Lonchocarpus cultratus*, (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima, pela bióloga sistemata da UNIOESTE, Prof^a. Dr^a. Livia Godinho Temponi.

Obtenção dos extratos vegetais

O material vegetal (raízes e sementes), após secagem em estufa de ar circulante, foi moído separadamente, pesado e submetido a sucessivas extrações em hexano, filtrado e concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, para

produzir os extratos hexânicos das raízes (**LHR**) e o das sementes (**LHS**). Os resíduos vegetais restantes foram novamente submetidos ao mesmo procedimento, empregando-se, desta vez, o solvente diclorometano. Assim, os extratos diclorometânicos das raízes (**LDR**) e o das sementes (**LDS**) foram obtidos. A seguir, extratos metanólicos das raízes (**LMR**) e de sementes (**LMS**) foram produzidos, repetindo-se o mesmo processo, mas com o solvente metanol (Simões et al., 2007). A Figura 1 mostra o esquema do procedimento experimental do trabalho.

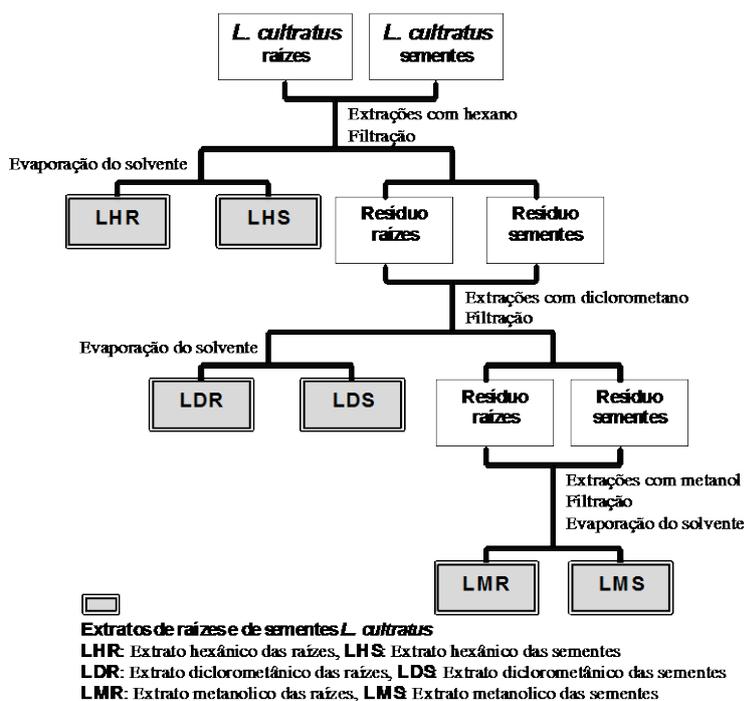


FIGURA 1. Esquema de procedimento experimental do trabalho

Caracterização dos extratos vegetais

Os extratos vegetais das raízes (**LHR**, **LDR** e **LMR**) e os das sementes (**LHS**, **LDS** e **LMS**) foram caracterizados por métodos analíticos qualitativos, que empregam reações com precipitações ou aparecimento de cor para investigar a presença de classes de metabólitos secundários (saponinas, esteróides, triterpenóides, alcalóides, taninos, cumarinas, e flavonoides). A reação de Liebermann-Burchard foi utilizada para verificar a presença de esteróides e

triterpenos (Silva et al., 2010); os reagentes de Dragendorff e Mayer, para investigar alcalóides e a reação com sais de ferro, para detectar fenóis e taninos (Michelin et al. 2005). Foram realizados testes, segundo Barbosa-Filho et al. (2005), para saponinas e cumarinas, enquanto que para detectar flavonóides, utilizou-se a Reação de Shinoda ou de cianidina. Outros compostos fenólicos, como por exemplo: chalconas e antocianinas foram investigados, através de reações que produziram alterações de pH (Sahu et al., 2010).

Testes de atividade antibacteriana

Os ensaios foram feitos no Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nereida da Rosa Gioppo. O teste de difusão em disco foi realizado, de acordo com Kirby & Bauer (NCCLS, 2003), com modificações. A sensibilidade bacteriana foi avaliada por meio da formação de halos de inibição do crescimento microbiano em placas de Petri estéreis, contendo ágar Mueller-Hinton. Cada placa foi semeada, com uma das 4 cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25933. Cada cepa foi padronizada em soluções de $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹, de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland. A seguir, 8 discos de papel filtro estéril (6 mm Ø) foram depositados na superfície de cada placa semeada e cada disco foi umedecido com 10 µL de um dos extratos nas concentrações de 1, 10, 15, 50, 100, 150, 175 µg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹ (cada extrato vegetal, das raízes: LHR, LDR, LMR e das sementes: LHS, LDS e LMS foi previamente dissolvido em dimetilsulfóxido-DMSO, até no máximo 2% do volume total da solução aquosa nas diferentes concentrações). Foram também empregados um **controle negativo**, constituído por um disco de papel filtro umedecido com 10 µL de solução de DMSO e água (2%) e

um **controle positivo**, constituído por um disco impregnado com o antibiótico polimixina (300 UI), na análise de *P. aeruginosa*, vancomicina (30 µg) na de *Staphylococcus aureus* e de *Enterococcus faecalis* e imipenem (10 µg) para o teste com *Escherichia coli*. Todas as placas foram incubadas em estufa à 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes químicos realizados com os extratos das raízes e das sementes de *L. cultratus* mostraram que metabólitos secundários estão presentes em todos os extratos, tanto os obtidos com solventes menos polares, quanto nos produzidos com solventes mais polares. A ausência de taninos ficou evidente em todos os extratos; os alcalóides, especialmente nos mais polares (LMR e LMS); chalconas nos extratos de raízes e de sementes (LHR e LDS); cumarinas em vários extratos (LDR, LHS e LDS); flavonóides, somente no extrato menos polar das raízes (LHR) e triterpenos em quase todos, exceto no mais polar das raízes (LMR). Os resultados de todos os testes são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados de testes químicos com extratos de *L. cultratus*

Classe de metabólitos	Teste químico	Extratos vegetais					
		Raízes			Sementes		
		LHR	LDR	LMR	LHS	LDS	LMS
Alcalóides	Dragendorff	-	-	-	-	-	+
	Mayer	-	-	+	+	-	+
Chalconas	Mudança de cor	+	-	-	-	+	-
Cumarinas	Fluorescência	-	+	-	+	+	-
Esteróides	Mudança de cor	-	-	+	-	-	-
Fenóis	FeCl ₃ c/ cor	-	-	+	-	+	+
Flavonóides	Shinoda	+	-	-	-	-	-
Saponinas	Presença de espuma	-	-	+	-	-	+
Taninos	FeCl ₃ c/ ppt	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	Mudança de cor	+	+	-	+	+	+

Obs.: (+) presente e (-) ausente

LHR, extrato hexânico das raízes; LDR, extrato diclorometânico das raízes; LMR, extrato metanólico das raízes;

LHS, extrato hexânico das sementes; LDS, extrato diclorometânico das sementes e LMS, extrato metanólico das sementes.

Mello et al. (1974) isolaram 4 chalconas do extrato etanólico de cascas de raízes de *L. neuroscapha*. Estas substâncias mostraram atividade antimicrobiana acentuada, dirigida especialmente a bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *E. faecalis* (concentrações inibitórias mínimas, CIM - entre 2-4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até >15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

De acordo com Silva & Tozzi (2012), *L. neuroscapha* é sinônimo de *L. cultratus*, tratando-se, portanto, da mesma planta.

Assim, uma vez que os testes químicos mostraram a presença de chalconas no extrato das raízes (LHR) e no das sementes (LDR) de *L. cultratus*, esperávamos obter atividade antimicrobiana frente às cepas de bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis*. Entretanto, estes extratos não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana, nem frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*), tampouco frente às Gram-negativas, como o esperado. Este resultado foi surpreendente, porque, embora a atividade antimicrobiana de metabólitos isolados das raízes da planta tivesse sido investigada, a de extratos de semente é inédita.

Concluimos que a ausência de atividade antimicrobiana nos extratos de *L. cultratus*, principalmente no extrato das raízes (LHR), cuja propriedade foi reportada anteriormente na literatura científica, sugere problemas relacionados à estabilidade ou concentração muito baixa de chalconas bioativas no extrato. A solução destas questões requer estudos futuros mais específicos.

AGRADECIMENTOS

À Capes, pelas bolsas concedidas às acadêmicas Aline Griebler e Aline Antunes Maciel do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALEET, M.R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.919-922, 2005.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R.A.; GUEDES, D.N.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.392-413, 2005.
- CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. **Química de Produtos Naturais – Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**, Itajai: Ed. Univali, 2012. p.21.
- MAGALHÃES, A.F.; TOZZI, A.M.; MAGALHÃES, E.G.; NOGUEIRA, M.A.; QUEIROZ, S.C. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Phytochemistry**, v.55, n. 7, p.787-92, 2000.
- MAGALHÃES, A.F; TOZZI, A.M.G.A.; MAGALHÃES, E.G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M.D.P.C.; PEREZ, M.A.F. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v.79, n.3, p.351-367, 2007.
- MELLO, J.F. LIMA, O.G.; ALBUQUERQUE, M.M.F.; MARINI-BETTOLO, G.B.; LYRA, F.D.A.; SILVA, E.C.S.; BARRON, J.S.; OLVEIRA, E.L. O- and C-Prenylated chalcones with antibiotic and antineoplastic activity isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. **Revista do Instituto de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife**, v.14, n.1-2, 1974.
- MENICHINI, F.; MONACHE, D.F.; BETTOLO, G.B.M. Flavonoids and rotenoids from Tephrosieae and related tribes of leguminosae. **Planta medica**, v.45, n.4, 1982.
- MICHELIN, D.C.; IHA, S.M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C.D.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.209-211, 2005.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8**. NCCLS, Pennsylvania USA, 2003.
- SAHU, V.K.; RAGHUVeer, I.; ALOK, S.; HIMANSHU, G. Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the ethanolic extract of whole plant extract of *Dendrophthoe falcata* (LF) Ettingsh. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**, v.1, n.1, p 39-45, 2010.
- SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, 2010.
- SILVA, M.J.; TOZZI, A.M.G.A. Revisão Taxonômica de *Lonchocarpus* s. str (Leguminosae, Papilionoideae) do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6ªed. Editora da UFSC e UFRGS Editora. 2007.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; ALENCAR, D.B.; SAKER-SAMPAIO, S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; SANTOS, H.S.; BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; CAVADA, B.S.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M.O.; TEIXEIRA, E.H. Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated from *Lonchocarpus obtusus*. **BioMed Research International**, p1-9, 2014.

Capítulo 2

**Artigo científico a ser submetido à revista Phytomedicine - International
Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology (Qualis B1)**

Avaliação de hemotoxicidade e da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de sementes de *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima

Aline Griebler^a, Aline Antunes Maciel Bortoluzzi^a, Patricia Karoline Matos^a, Jéssica Patrícia Borges da Silva^b, Rafael Andrade Menolli^a, Rinaldo Ferreira Gandra^a, Edson Antonio Alves da Silva^c, Tereza Cristina Marinho Jorge^{a*}

^a Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE, Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário, Cascavel - PR, 85819-110, Brasil

^b Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE, Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário, Cascavel - PR, 85819-110, Brasil

^c Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE, Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário, Cascavel - PR, 85819-110, Brasil

*Autor para correspondência: tereza.jorge@unioeste.br

Resumo

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é considerada doença tropical negligenciada. É endêmica em 21 países na América Latina, inclusive no Brasil, e apresenta elevado índice de mortalidade. Essa doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo, levando a morte de 12 000 pacientes por ano. O tratamento da tripanossomíase é problemático. O arsenal terapêutico é escasso, com efeitos colaterais e, frequentemente, ineficaz. A planta *Lonchocarpus cultratus* (*Fabaceae*) possui ação comprovada frente ao sarcoma 180 e contra bactérias Gram-positivas. Os principais constituintes químicos identificados são a cordoína, a isocordoína, a derricina e triterpenos. No momento atual, existe grande interesse em agentes tripanocidas naturais e, a planta *Lonchocarpus cultratus*, além de pouco estudada, é constituinte de um gênero, cujas espécies vegetais apresentam substâncias anti-*Trypanosoma cruzi*. O extrato de sementes de *L. cultratus* foi estudado com o objetivo de investigar a atividade anti-*T. cruzi* e respectiva hemotoxicidade. Extratos hexânico, diclorometânico e metanólico foram obtidos de sementes desta espécie, sendo que os extratos hexânico e diclorometânico apresentaram atividade contra o protozoário *T. cruzi*. Os resultados do extrato diclorometânico mostraram inibição de crescimento do protozoário de 92,30% na concentração de 175 µg.mL⁻¹. O valor de CI₅₀ para este extrato foi 6,16 µg.mL⁻¹ e nesta concentração não apresentou toxicidade para as

hemácias. Embora haja necessidade de pesquisas adicionais, os resultados anti-*T. cruzi* e de hemotoxicidade obtidos com o extrato diclorometânico mostram potencial alternativa para o tratamento da Doença de Chagas.

Palavras-chave: Lonchocarpus, Doença de Chagas, Fabaceae, citotoxicidade,

Abreviaturas

LHS: extrato hexânico de sementes de *Lonchocarpus cultratus*;

LDS: extrato diclorometânico de sementes de *Lonchocarpus cultratus*;

LMS: extrato metanólico de sementes de *Lonchocarpus cultratus*;

LIT: meio Liver Infusion Triptose;

DMSO: dimetilsulfóxido;

BZN: controle positivo Benznidazol;

CN: controle negativo;

CB: controle branco;

CP: controle positivo;

CI₅₀: concentração capaz de inibir 50% da proliferação dos parasitas;

MR: medicamento referência Benznidazol;

PBS: solução tampão fosfato salino;

CC₅₀: concentração citotóxica hemolítica de 50% dos eritrócitos;

RMN: ressonância magnética nuclear;

CDCI₃: clorofórmio deuterado;

Introdução

O descobrimento da tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, em 1909, foi considerado um marco para a comunidade científica da época, descrevendo uma nova patologia e contribuindo para o desenvolvimento da medicina tropical e dos estudos sobre as doenças parasitárias (Dias e Coura 1997).

Mais de cem anos se passaram e a tripanossomíase ainda é um processo relevante para a saúde pública de vários países do mundo, principalmente os de regiões tropicais, com baixo desenvolvimento social (OPAS 2009).

Atualmente, existem cerca de 8 milhões de portadores de doença de Chagas no planeta e aproximadamente 12000 mortes anuais decorrentes desta doença (WHO 2014). No Brasil, entre 2009 e 2013, foram registrados mais de 23 000 óbitos (Dias et al. 2016).

A transmissão mais comum da tripanossomíase ocorre através de insetos hematófagos, que atuam como vetores. Este tipo de transmissão causa endemias em 21 países da América Latina. A infecção ocorre quando dejetos do inseto contaminado com o agente etiológico, o protozoário *Trypanossoma cruzi*, são introduzidos na corrente sanguínea do hospedeiro, pelo ato de coçar o local, após a picada do inseto (Brener et al. 2000).

Países considerados não endêmicos como Canadá, Espanha e Estados Unidos da América (EUA) erradicaram o inseto-vetor, entretanto continuam apresentando portadores da doença. Estima-se que nos EUA existam mais de 300 mil casos da enfermidade e aproximadamente 100 mil relatos no continente europeu (Traina et al. 2016). Nestes países, a infecção ocorre principalmente por transfusões de sangue contaminado (Angheben et al. 2015). A transmissão transplacentária é outra forma de contágio, que acontece através do sangue materno. A taxa de transmissão materna para lactentes atinge até 12% dos casos de mães contaminadas. Em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América e Canadá, por exemplo, dados recentes estimam que anualmente, para 4 000 mães portadoras, aproximadamente 200 recém-nascidos podem estar infectados com *T. cruzi* (Traina et al. 2016).

Atualmente, a transmissão oral, a partir da ingestão de alimentos contaminados com o parasita ou seus dejetos, também vem aumentando (Brasil, 2010). As fezes de triatomíneos contaminados podem manter o protozoário com potencial infectante por várias horas, se o ambiente estiver úmido e, além de contaminar diretamente os alimentos, também podem contaminar patas e aparelho bucal de moscas e baratas. No Brasil, a imprensa tem noticiado, frequentemente, casos de contaminação oral, principalmente por ingestão de caldo de cana de açúcar e de açaí. Uma dessas notícias foi vinculada em meios de comunicação local e relatam o aumento, no ano de 2016, de mais de 200% dos casos de doença de chagas em relação ao ano de 2015, no estado do Acre, todos estes eventos relacionados à ingestão de açaí contaminado, demonstrando a gravidade da situação. Estudos experimentais mostraram que alimentos como leite *in natura* ou caldo de cana de açúcar mantém o parasita viável por até 24 horas em temperatura ambiente (Dias et al. 2016). Fontes do Ministério de Saúde Brasileiro indicam que entre 2005 e 2013 ocorreram mais de 100 contaminações por via oral no território nacional (Brasil 2015).

Um dos objetivos do tratamento da doença de Chagas, além de eliminar a infecção, é prevenir lesões em órgãos importantes, como o coração, fígado e estômago (Coura et al. 1997). A respeito da gravidade dos quadros clínicos, existem somente dois medicamentos certificados para o tratamento: Nifurtimox e Benznidazol. Estas substâncias apresentam ação efetiva, apenas em pacientes na fase inicial da doença. Contudo, esta fase geralmente é assintomática e na maioria das vezes, os portadores somente procuram assistência médica quando a infecção é crônica, ou seja, encontra-se em estágio avançado (Rassi et al. 2000).

O emprego de Nifurtimox e Benznidazol para o tratamento da fase crônica é questionável, porque, além de efeitos colaterais intensos, apresentam baixa efetividade na terapêutica (Castro et al. 2006). Assim, o desenvolvimento de novas drogas anti-*T. cruzi* é relevante.

As plantas medicinais são utilizadas em medicina popular no tratamento de doenças parasitárias. Muitos trabalhos corroboram a importância terapêutica dos produtos naturais na tripanossomíase americana (Bezerra et al. 2012). Substâncias de origem natural de diversas classes, como quinonas, flavonóides, alcalóides e terpenos apresentam atividade anti-*T. cruzi* e tem potencial para direcionar o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas (Guimarães et al. 2007).

As plantas constituintes do gênero *Lonchocarpus* destacam-se por apresentarem diversas atividades biológicas. Magalhães et al. (2007) reportaram atividade antimicrobiana em *Lonchocarpus montanus* e Borges-Argaez et al. (2007) publicaram a presença dos efeitos leishmanicida e tripanosomicida em *Lonchocarpus xuul*.

Entre as plantas constituintes do gênero *Lonchocarpus*, a espécie *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima foi pouco estudada. A caracterização de seus metabólitos secundários não está elucidada, embora alguns de seus constituintes como alcalóides (Magalhães et al. 2002), triterpenos, chalconas (Mello et al. 1974) e flavonas (Menichini et al. 1982) tenham sido identificados. Algumas atividades biológicas como a anti-bactérias Gram-positiva foi observada por Mello et al. (1974) e a ação antiproliferativa das células de Carcinoma de Ehrlich e de Sarcoma 180 foi reportada por Moreira et al. (1973).

Considerando o potencial de atividades biológicas das plantas do gênero *Lonchocarpus*, especialmente a atividade anti-*T. cruzi*, a escassez de estudos com a espécie *L. cultratus*, a problemática da doença de Chagas e respectivo tratamento,

optou-se por realizar este trabalho, cujo objetivo foi investigar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e a citotoxicidade de extratos das sementes de *L. cultratus*.

Materiais e métodos

Material vegetal

Amostras das sementes de *Lonchocarpus cultratus* foram coletadas de um exemplar que cresce às margens do Lago Municipal de Cascavel, PR (S 24.96308°e O 53.43674°), em maio de 2015. Folhas e galhos também foram coletados para confecção de exsicata, depositada no Herbário da UNIOESTE (UNOP n.º. 1889). A planta foi identificada como *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima, pela bióloga sistemata da UNIOESTE, Prof^a. Dr^a. Livia Godinho Temponi.

Obtenção dos extratos vegetais

No presente trabalho, foram utilizados solventes de polaridades diferentes: hexano (Anidrol), diclorometano (Quemis) e metanol (Tedia), destilados previamente.

O material vegetal coletado, após secagem em estufa de ar circulante (< 40°C), foi triturado e submetido a macerações sucessivas em hexano, a seguir, filtrado e o resíduo vegetal submetido ao mesmo processo, empregando diclorometano e após, metanol. O solvente foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida, para produzir os extratos hexânicos (LHS), diclorometânico (LDS) e metanólico (LMS).

Teste de atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro.

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT), suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 28°C, e repicadas de cinco em cinco dias. Os experimentos foram realizados com parasitas na fase logarítmica de crescimento (Borges 2012).

Os testes foram efetuados com culturas de protozoários (1.10^5 parasitas.mL⁻¹) na presença de cada extrato (LHS, LDS e LMS), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a no máximo 2%, em diferentes concentrações: 1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg.mL⁻¹. Um procedimento semelhante foi realizado com Benznidazol nas mesmas concentrações dos extratos (controle positivo - BZN). O meio de cultura LIT com o protozoário (1.10^5 parasitas.mL⁻¹) e 2% de DMSO foi empregado no teste como controle negativo (CN), para testar a interferência do solvente utilizado na dissolução dos extratos vegetais e do controle positivo sobre o crescimento dos parasitas. O meio LIT, com somente o protozoário (1.10^5 parasitas.mL⁻¹), foi

considerado controle branco (CB).

O bioensaio foi realizado em triplicatas, em tubos com cada um dos três extratos e cada controle (BZN, CN e CB), sendo que o volume final de cada tubo foi de 3 mL (Pizzolatti et al. 2003).

O crescimento celular foi avaliado após 72 horas, por contagem direta do número de parasitas, em câmara de Neubauer, com aumento de 400 vezes em microscópio óptico Olympus CBA.

Os parâmetros utilizados para estudar o crescimento dos protozoários foram:

- (a) percentual da taxa de crescimento (TC%) e
- (b) percentual de inibição de crescimento dos protozoários (CI%).

O percentual da TC% mostra a relação entre o número de protozoários vivos após 72 horas de cultivo em LHS, LDS, LMS e BZN com o número de protozoários no controle branco (Muelas-Serrano et al., 2000) e foi calculado pela seguinte fórmula:

$$TC\% = \left(\frac{MC}{MCB} \right) \cdot 100$$

onde:

TC%= percentual da taxa de crescimento;

MC = média da contagem de crescimento das triplicatas de cada controle e de cada concentração de benznidazol e dos extratos vegetais;

MCB = a média de crescimento no controle branco.

O percentual de inibição do crescimento dos protozoários (CI%) foi dado por:

$$CI\% = 100 - TC\%$$

onde:

CI% = percentual de inibição do crescimento dos protozoários

TC% = percentual da taxa de crescimento.

Os dados de porcentagem de inibição de crescimento foram usados para calcular a concentração de cada um dos extratos e do controle positivo, que foi capaz de inibir 50% da proliferação dos parasitas (CI₅₀).

Teste de ação hemotóxica

Atualmente, a atividade hemolítica tem sido utilizada para verificar a toxicidade de substâncias bioativas frente a hemácias humanas (Kalaivani et al. 2011). Desta forma, as propriedades hemolíticas vêm sendo estudadas conjuntamente a várias atividades biológicas de extratos vegetais, especialmente as antiproliferativas e anti-parasitárias (Prakash et al. 2016 e Luize et al. 2005).

A atividade citotóxica dos extratos vegetais sobre as hemácias humanas foi baseada em Paris et al. (2016). Eritrócitos de indivíduo saudável foram lavados três vezes com solução tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, por centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos.

Alíquotas de extrato vegetal, dissolvidas em DMSO (máx. 2%) foram adicionadas a tubos contendo 500 µL de eritrócitos em PBS (4%), para obter as concentrações de 1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg.mL⁻¹, com volume final de 1 mL cada. Esse procedimento foi realizado com cada um dos extratos vegetais (LHS, LDS e LMS) e com o medicamento referência Benznidazol – LAFEPE (MR).

O controle branco (CB) foi utilizado sem os extratos vegetais, constituindo-se de apenas DMSO (2%), 500 µL eritrócitos (4%) em PBS e solução tampão em quantidade suficiente para completar 1 mL.

O controle negativo (CN) constituiu-se da suspensão de 500 µL de eritrócitos (4%) em PBS e solução tampão, com volume final de 1 mL.

O controle positivo (CP) foi utilizado como padrão de hemólise máxima, obtido pela adição de 500 µL de ácido acético 2% (solução de *lise*) e 500 µL de eritrócitos (4%) em PBS, com volume final de 1 mL.

Todos os tubos foram incubados durante 1 h, à 37°C e a seguir, centrifugados à 1500 rpm, por 10 min para sedimentação celular. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em espectrofotômetro UV-VIS, FEMTO 600 S, em λ 450 nm. O teste foi realizado em triplicata.

O efeito tóxico nas hemácias, causado pela presença dos extratos vegetais, foi analisado através da quantidade de eritrócitos íntegros restantes e do percentual de hemólise, usando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{eritrócitos intactos} = 1 - \left(\frac{A \text{ sobrenadante das amostras} - A \text{ controle branco}}{A \text{ controle positivo} - A \text{ controle negativo}} \right) \times 100$$

onde:

A = Absorbância do sobrenadante de cada extrato, de MR, de CB, CN e CP

$$\% \text{ de hemólise} = 100 - \% \text{ de eritrócitos intactos}$$

Os dados percentuais de hemólise foram empregados na obtenção da equação matemática, que representa o comportamento de hemotoxicidade de cada

extrato e de MR, com o objetivo de calcular a concentração citotóxica hemolítica de 50% dos eritrócitos (CC_{50}).

O índice de seletividade (IS) demonstra a relação entre citotoxicidade e atividade biológica (Lenta et al. 2007), ou seja, mede quanto um composto é ativo contra o parasita, sem causar danos à viabilidade celular de mamíferos. O IS foi obtido, calculando-se a razão entre o valor de CC_{50} e o valor capaz de inibir 50% da proliferação de *T. cruzi* (CI_{50}). Quanto maior for o IS, mais seletiva é a droga sobre o parasita. Conseqüentemente, menor será o efeito sobre a célula hospedeira (Nakamura et al. 2006).

Análise estatística

Os valores de taxas de crescimento (TC%) do protozoário e de concentração inibitória (CI%) do extrato, frente a *T. cruzi*, foram calculados através do programa Excel 2010 (Microsoft®).

Um gráfico de dispersão de dados foi construído para cada extrato (LHS, LDS e LMS) com os valores percentuais de inibição de *T. cruzi* (CI%) e as concentrações estudadas de cada extrato. Os pontos desse diagrama foram ajustados, empregando modelo logarítmico (não linear). O cálculo da concentração de extrato necessária para inibir 50% dos protozoários (CI_{50}) foi obtido, utilizando equações do modelo não linear.

As médias de crescimento dos protozoários foram obtidas com dados do crescimento dos parasitas frente às diferentes concentrações de cada extrato.

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi empregado para avaliar as diferenças entre as médias de crescimento dos protozoários na presença de cada extrato com os controles (Vieira 2003). O software R (R-Core Team 2014) foi utilizado para o processamento dos dados, com um nível de significância de 5%.

Os valores obtidos de porcentagem de hemólise foram plotados em gráficos de dispersão, empregando o programa Excel 2010 (Microsoft®). As equações lineares correspondentes às concentrações de cada extrato vegetal, versus porcentagem de hemólise, possibilitaram avaliar a concentração hemotóxica de 50% (CC_{50}) e a toxicidade de cada extrato na concentração de CI_{50} de atividade anti-tripanosômica. Os valores de IS foram calculados, utilizando o Excel 2010 (Microsoft®).

Resultados e discussões

A extração das sementes secas e trituradas de *L. cultratus* (313,26 g) com hexano produziu 95,94g do extrato LHS, com diclorometano 8,17g de LDS e com metanol 16,45 g de LMS.

A Figura 1 apresenta o esquema de obtenção dos extratos de *L. cultratus*.

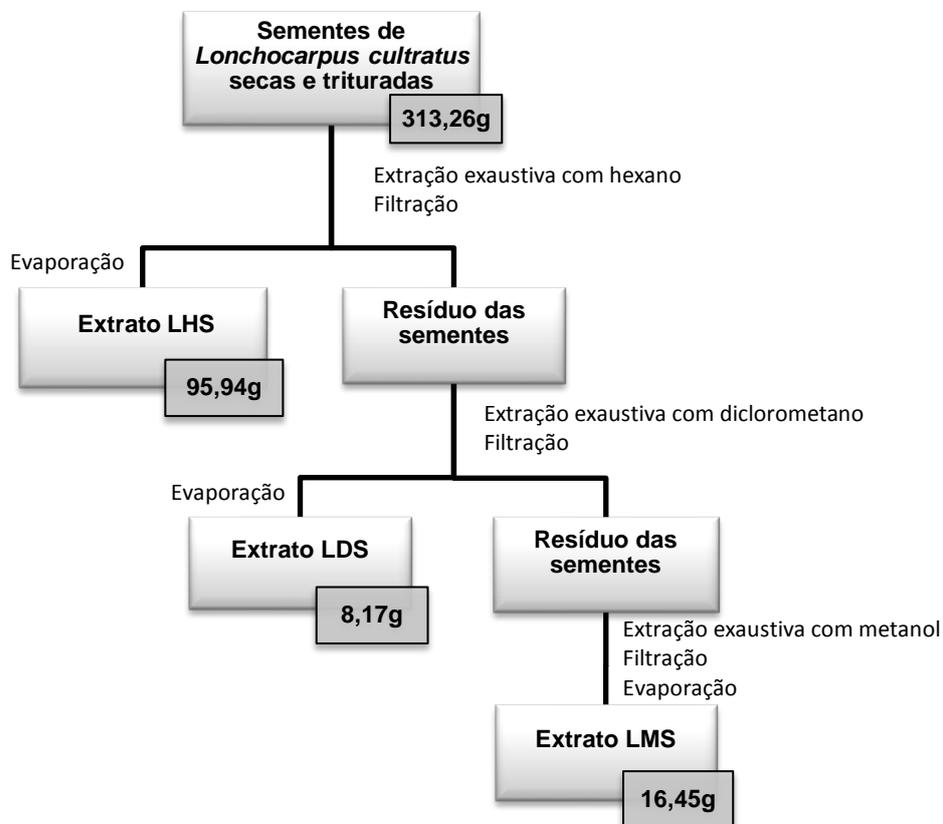


Figura 1 Esquema de obtenção dos extratos LHS, LDS e LMS

Caracterização química dos extratos

Os Anexos 1 a 3 apresentam os espectros de RMN ^1H (500MHz) dos extratos LHS, LDS e LMS realizados em clorofórmio deuterado (CDCl_3).

O espectro de RMN ^1H de LHS (Anexo 1A) mostra em δ 13,68 ppm um sinal de hidrogênio em interação forte, como o de $-\text{OH}$ em ponte intramolecular entre H e $\text{C}=\text{O}$. Sinais nesta região estão relacionados ao de $-\text{OH}$ quelada das estruturas químicas de chalconas características de *Lonchocarpus*. A seguir, entre δ 7,90-7,42 ppm estão sinais relativos a hidrogênios ligados a carbonos de anéis aromáticos, possivelmente os dos anéis "A" e "B" de chalcona. Em δ 7,59 e 7,86 ppm há dois sinais em regiões de hidrogênio em carbonos a e b de ligação dupla conjugada ao anel aromático e $\text{C}=\text{O}$, além de sinais duplos em δ 6,77-6,38 ppm (Anexo 1B) que podem corresponder a $\text{H}4''$ e $\text{H}5'$ do núcleo de chalcona. Os outros sinais em campo

mais baixo, entre δ 5,61-0,86 ppm (Anexo 1C) indicam, entre outras, ligações de grupos metínicos, metilênicos e metílicos ($-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$), podendo indicar a presença da chalcona Lonchocarpina e também, de outras substâncias presentes no extrato.

O espectro de RMN ^1H de LDS apresenta 3 sinais que aparecem em δ 13,81, 13,68 e 13,57 ppm (Anexo 2A) e indicam a presença de 3 sinais semelhantes ao apresentado nesta região do espectro de RMN ^1H de LHS. Da mesma forma, estão relacionados ao hidrogênio de $-\text{OH}$ quelada com $\text{C}=\text{O}$. Estes três sinais sugerem 3 substâncias diferentes, provavelmente chalconas. O sinal em δ 13,68 ppm também está presente em LDS. Nos campos mais baixos do espectro de LDS (Anexo 2B), repete-se o padrão de sinais de chalconas: em δ 7,44 e 7,66 ppm, multipletos que podem estar relacionados a hidrogênios aromáticos (H_2/H_6 e H_3/H_5) do anel "B" de uma chalcona; dois dubletos em δ 7,87 e 7,59 ppm, provavelmente de hidrogênio em carbonos a e b de dupla ligação conjugada à anel aromático e $\text{C}=\text{O}$. Os demais sinais na região entre δ 5,62 e 3,74 ppm (Anexo 2C e 2D) estão relacionado a diversas ligações de hidrogênios em grupos $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ de substituintes do núcleo fundamental do metabólito.

O espectro de RMN ^1H de LMS não apresenta sinais em regiões de campo alto como nos espectros anteriores, indicando a ausência das chalconas mencionadas nos dois espectros anteriores (de LHS e LDS). Os sinais do espectro de LMS aparecem, principalmente na região entre δ 5,50-0,80 ppm (Anexo 3A). Estes sinais são característicos de ligações de hidrogênio polares, em carbonos ligados a elementos eletronegativos e em grupos $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ de compostos alifáticos, sugerindo a presença de esteróides e terpenos. O sinal em $\delta > 7,0$ ppm sugere a presença de anel aromático (Anexo 3B).

Teste de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Os resultados do teste de atividade anti-*T. cruzi* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Percentuais de crescimento de *T. cruzi* frente à diferentes concentrações dos extratos de sementes de *L. cultratus* e controle positivo

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	TC%			
	LHS \pm DP	LDS \pm DP	LMS \pm DP	Controle BZN \pm DP
1	79,33 \pm 5,77	75,49 \pm 6,00	89,76 \pm 1,84	82,77 \pm 12,20
10	72,51 \pm 2,74	40,95 \pm 3,68	87,84 \pm 7,38	14,90 \pm 0,25
15	62,12 \pm 10,03	38,44 \pm 1,39	88,99 \pm 2,02	13,34 \pm 2,63
50	56,01 \pm 1,84	19,50 \pm 1,01	87,71 \pm 1,63	2,04 \pm 0,43
100	41,24 \pm 5,02	15,88 \pm 1,09	86,81 \pm 2,70	0
150	32,28 \pm 5,08	12,81 \pm 0,38	86,68 \pm 1,18	0
175	31,36 \pm 2,08	7,70 \pm 1,33	86,30 \pm 12,02	0

Obs.: TC%, taxa percentual de crescimento do protozoário; LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico; LMS, extrato metanólico, BZN, controle positivo e DP, desvio padrão

Os valores das taxas de crescimento do protozoário no controle branco (CB) foram considerados 100%. Os resultados de TC% de BZN, assim como o dos extratos LHS, LDS e LMS diminuiram, à medida que as concentrações do controle e dos extratos aumentaram.

Os valores de TC% foram usados para calcular a concentração inibitória (CI%) de cada extrato e os resultados utilizados na construção do gráfico da Figura 2.

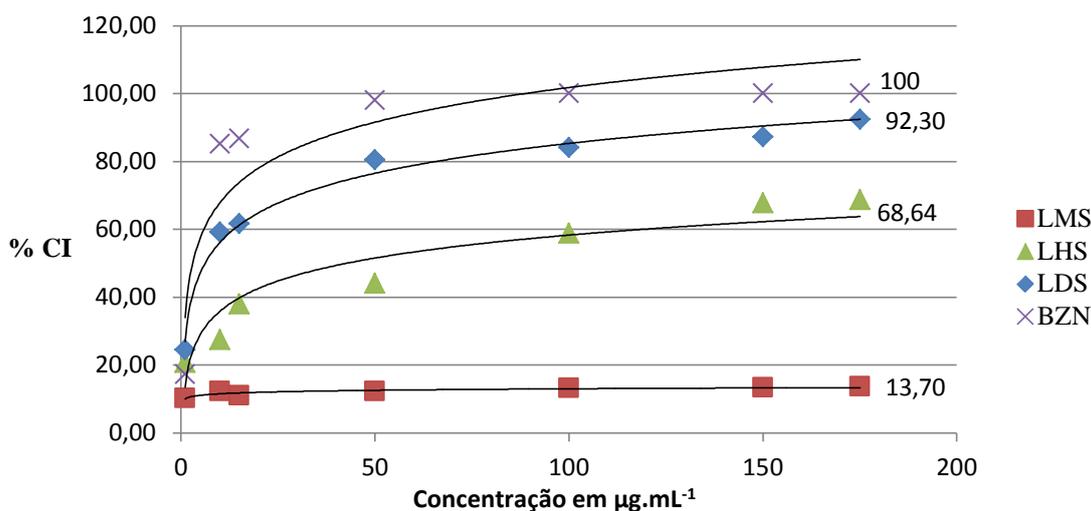


Figura 2 Inibição do crescimento de *T. cruzi* (CI%) em relação à concentrações de LHS, LDS e LMS de *L. cultratus* e controle BZN

A observação da Figura 2 mostrou que os extratos LDS e LHS inibiram o crescimento do parasita *T. cruzi*, contudo, na concentração de 175 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a inibição de LHS (68,64%) foi menor que de LDS (92,30%). Estes dados indicam que o extrato LDS é mais ativo que LHS e LMS. Como Menchini et al. (1982) reportaram,

o isolamento de flavonas e chalconas em sementes de *L. cultratus* e, posteriormente, Borges-Argáez et al. (2009) demonstraram que a chalcona Lonchocarpina e a dimetipiranoflavona isoladas das raízes de *L. xuul* apresentaram atividade anti-*T. cruzi*, presume-se, conforme verificado nas análises de RMN, que metabólitos desta classe estejam presentes em LHS e LDS e que sejam responsáveis pelos resultados observados.

A Tabela 2 apresenta os dados de CI_{50} de cada extrato vegetal e do controle BZN. Estes valores foram calculados a partir de equações que representam os gráficos de dispersão entre $CI\%$ e as diferentes concentrações de cada extrato empregadas nos testes.

Tabela 2 Dados de CI_{50} dos extratos LDS, LHS, LMS e controle BZN

Extratos e BZN	CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
LDS	6,16
LHS	42,58
LMS	Não ativo
BZN	2,97

Obs.: LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico; LMS, extrato metanólico; e BZN, controle positivo

Segundo Osorio et al. (2007), os extratos vegetais podem ser classificados como: muito ativos ($CI_{50} < 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ativos ($10 < CI_{50} < 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), moderadamente ativos ($50 < CI_{50} < 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e inativos ($CI_{50} > 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). De acordo com esta classificação, o extrato LHS é ativo, o LMS inativo e o LDS, muito ativo.

O teste estatístico de Wilcoxon mostrou que o crescimento dos protozoários no extrato LDS e no controle positivo BZN não apresentou diferença significativa (p -valor $> 0,05$), portanto, estatisticamente, a inibição de LDS é igual a exercida do controle positivo, que é o medicamento usado no tratamento da tripanossomíase. Da mesma forma, o extrato LMS e o controle negativo CN são estatisticamente semelhantes (p -valor $> 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 Dados de p -valor entre os extratos e controles

Controles	Extratos		
	LHS	LDS	LMS
CN	$< 0,001$	$< 0,001$	0,6388
BZN	$< 0,001$	0,1863	$< 0,001$
CB	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$

Obs.: LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico; LMS, extrato metanólico; CN, controle negativo; BZN, controle positivo e CB, controle branco

A comparação, realizada pelo teste de Wilcoxon, entre os dados obtidos no controle negativo CN e controle branco CB mostrou que existiu uma significativa diferença entre os dados dos dois controles (p-valor de 0,0243), podendo-se afirmar que a quantidade de parasitas no controle branco foi maior do que no controle negativo, mostrando que o solvente DMSO exerceu influência no crescimento dos *T. cruzi*. Avaliando a Tabela 3, observa-se que os resultados de p-valor encontrados na comparação do CN com os extratos LHS e LDS foram inferiores a 0,001, o que os caracteriza como significativamente diferentes, confirmando a atividade anti- *T. cruzi* dos mesmos. Em comparação ao LMS, os dados foram considerados estatisticamente iguais (p-valor 0,6388), fato que demonstra que este extrato não apresenta ação contra o protozoário e que a diminuição do crescimento do parasita verificada é, provavelmente, devido a característica de inibição do solvente utilizado para solubilização do extrato.

Teste de ação citotóxica em Hemácias

A toxicidade dos extratos LHS, LDS, LMS e BZN foi avaliada frente a eritrócitos humanos. O critério de avaliação foi a porcentagem de eritrócitos que permaneceram intactos após o teste (Tabela 4).

Tabela 4 Porcentagem de eritrócitos íntegros frente a LHS, LDS, LMS e MR

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Eritrócitos intactos (%)			
	LHS \pm DP	LDS \pm DP	LMS \pm DP	MR \pm DP
1	98,45 \pm 0,005	99,72 \pm 0,002	99,61 \pm 0,003	99,61 \pm 0,002
10	98,49 \pm 0,002	100,18 \pm 0,002	99,26 \pm 0,002	99,75 \pm 0,001
15	98,14 \pm 0,003	98,84 \pm 0,006	99,33 \pm 0,010	99,19 \pm 0,005
50	96,87 \pm 0,002	93,29 \pm 0,006	99,09 \pm 0,005	99,02 \pm 0,006
100	91,92 \pm 0,004	87,35 \pm 0,010	99,02 \pm 0,012	98,60 \pm 0,005
150	88,23 \pm 0,002	79,97 \pm 0,005	98,34 \pm 0,008	98,63 \pm 0,003
175	85,55 \pm 0,003	74,1 \pm 0,017	97,43 \pm 0,007	97,68 \pm 0,003

Obs.: LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico; LMS, extrato metanólico; MR (benznidazol), medicamento referência e DP, desvio padrão

Os valores percentuais de eritrócitos intactos nos controles negativo (CN) e controle branco (CB) foram de 100%, demonstrando que o DMSO, constituinte do CB na concentração de 2%, não é hemolítico. No controle positivo (CP), constituído por solução hemolítica apresentou valor nulo, ou seja, não foram verificados eritrócitos intactos. Os dados da Tabela 4 mostraram que, à medida que a concentração dos extratos aumentou, a porcentagem de eritrócitos intactos diminuiu, principalmente nos extratos LHS e LDS. Os percentuais de eritrócitos íntegros frente

ao extrato LMS e ao medicamento referência (MR) mostraram pequenas variações, indicando que não produziram hemólise nas concentrações estudadas.

Estes resultados foram utilizados para calcular o percentual de hemólise durante a realização do teste, e possibilitaram a construção do gráfico da Figura 3.

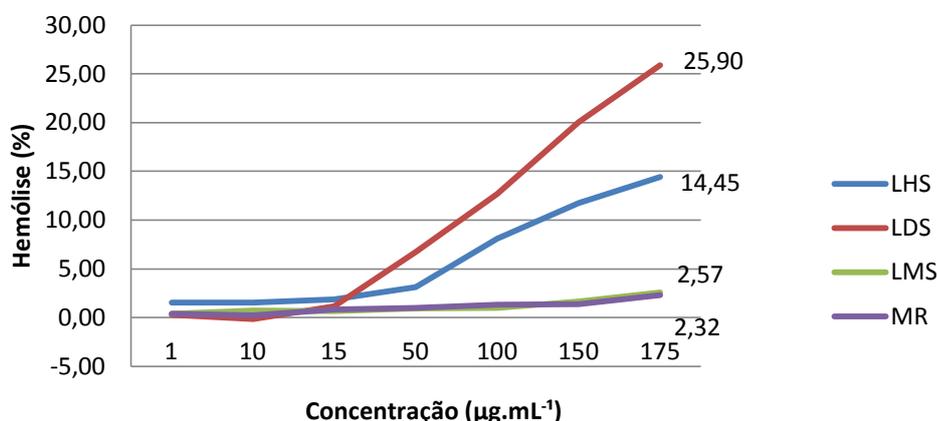


Figura 3 Percentuais de hemólise produzidos por LHS, LDS, LMS e MR

Os extratos LHS e LDS, em concentrações maiores que 15 µg.mL⁻¹, apresentaram percentuais de hemólise superiores ao LMS e ao medicamento usado no tratamento da tripanossomíase (MR). Entretanto, apesar do extrato LDS ser mais hemotóxico que LHS, LMS e MR, na concentração de 175 µg.mL⁻¹ apresentou 25,90% de hemólise, a anfotericina B, antibiótico frequentemente usado no tratamento de infecções, produz 100% de hemólise na concentração 100 µg.mL⁻¹ (Paris et al. 2016), o que indica baixa hemotoxicidade do extrato.

A partir do gráfico da Figura 3, foram obtidas equações que representam o comportamento hemotóxico de cada extrato e de MR. Assim, foi possível calcular a concentração citotóxica capaz de hemolizar 50% dos eritrócitos (CC₅₀). A obtenção dos valores de CC₅₀ permitiram conhecer o índice de seletividade (IS), que mede a capacidade do extrato e de MR selecionar o parasita, preferencialmente as hemácias (Tabela 5).

Tabela 5 Concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) e índices de seletividade (IS) dos extratos LHS, LDS e LMS e MR

Amostras	CC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IS
LHS	654,0	15,36
LDS	350,0	56,85
LMS	5 110,0	NC
MR	5 390,0	1 814,81

Obs.: LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico; LMS, extrato metanólico; MR, medicamento referência e NC, não calculado.

Os valores de CC_{50} da Tabela 5 representam a quantidade de extrato ou de MR capaz de exercer 50% de hemólise. Significa que, quanto maior o valor de CC_{50} , menor é a toxicidade sobre os eritrócitos.

A observação dos resultados de IS mostram que o extrato LHS e LDS são, respectivamente, 15,36 e 56,85 vezes menos tóxicos aos eritrócitos que aos parasitas. O valor de IS para o extrato LMS não foi calculado, porque não apresentou atividade contra o protozoário *T. cruzi*. Embora o medicamento referência (MR) apresente grau de seletividade superior a LDS e LHS, a relação entre a dose tóxica e a dose efetiva de LDS e LHS contra o parasita, é maior que 10, valor considerado adequado por Bézivin et al. (2003) e Mesquita et al. (2007).

A toxicidade de cada extrato (LHS e LDS) na concentração de CI_{50} anti-*T. cruzi* estão relacionadas na Tabela 6.

Tabela 6 Percentuais de hemólise dos extratos LHS, LDS e MR na CI_{50} anti-*T. cruzi*.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Hemólise (%)
LHS	42,58	3,86
LDS	6,16	0,00
MR	2,97	0,44

Obs.: LHS, extrato hexânico; LDS, extrato diclorometânico e MR (benznidazol), medicamento referência.

Os dados da Tabela 6 mostram que o extrato LDS não apresenta toxicidade para hemácias na concentração de CI_{50} antitripanosômica ($6,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Até a concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tanto o extrato LDS, como LHS, não são tóxicos no modelo estudado. A atividade hemolítica surge a partir desta concentração.

Cunha et al. (2003) avaliaram a capacidade hemolítica do extrato hexânico, de raízes de *L. sericeus* e de alguns metabólitos isolados do extrato (derricina e lonchocarpina), na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados do teste não mostraram atividade hemolítica. Dessa forma, fica evidente que a composição de metabólitos do extrato hexânico das raízes de *L. sericeus* difere do extrato hexânico das sementes de *L. cultratus*.

CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu afirmar que dos extratos de *L. cultratus* estudados, somente o hexânico (LHS) e diclorometânico (LDS) apresentam atividade antitripanosômica, sendo que LDS é mais ativo que LHS.

O teste de hemotoxicidade com os extratos mostrou que LDS, apesar de mais tóxico, não produz hemólise na concentração de CI_{50} anti-*T. cruzi* e apresenta melhor índice de seletividade em relação aos demais extratos.

Embora, na literatura científica existam poucas publicações sobre a constituição química das semente de *L. cultratus* e, diante do potencial anti-*T. cruzi* evidenciado por este trabalho, concluímos que a espécie merece ser mais estudada.

REFERÊNCIAS

Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., Aprili, G., 2015. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 13, 540-50. DOI 10.2450/2015.0040-15

Bezerra, W.S., Meneguetti, D.U.O., Camargo, L.M.A., 2012. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. *Saúde (Santa Maria)*, 38, 1.

Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le F.D., Boustie J., 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10, 499-503.

Borges-argaez, R., Balnbury, L., Flowers, A., Gimenez-turba, A., Ruiz, G., Waterman, P.G.; Peña-rodriguez, L. M., 2007. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus spp.* *Phytomedicine* 14, 530-533.

Borges, A., 2012. Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro sobre *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. RJ.

Borges-argaez, R., Balnbury, L., Flowers, A., Giménez-turba, A., Ruiz, G., Waterman, P.G., Peña-rodriguez, L.M., 2009. Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. *Planta Medica* 75, 12.

Brasil. Ministério da Saúde., 2010. Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de bolso, 8ª edição. Brasília. DF.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2015. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico* 46, 21, 1-9.

Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral neto, M., 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Castro, J.A., Meca, M.M., Bartel, L.C., 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol* 25 (8).

Coura, J.R., Abreu, L.L., Willcox, H.P.F., Petana, W., 1997. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica

da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. Rev Soc Bras Med Trop 30, 2.

Cunha, G.M.A., Fontenele, J.B., Nobre, H.V.J., Sousa, F.C.M., Silveira, E.R., Nogueira, N.A.P., Moraes, M.O., Viana, G.S.B., Costa-Lotufo, L.V., 2003. Cytotoxic Activity of Chalcones Isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. Phytotherapy Research 17, 155–159.

Dias, J.C.P., Coura, J.R., 1997. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ.

Dias, J.C.P., Cláudio, L.D.G., Lima, M.M., Albajar-Viñas, P., Silva, R.A., Alves, R.V., Costa, V.M., 2016. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. Epidemiol. Serv. Saude 25, 87-90.

Guimarães, D.A.S., Faria, A.R., 2007. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Farmacol 17(3).

Kalaivani, T., Rajasekaran, C., Suthindhiran, K., Mathew, L., 2011. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. indica (Benth.) Brenan. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 274741, 1-8. DOI:10.1093/ecam/nej060.

Lenta, N.B., Vonthron-Sénécheau, C., Soh F.R., Tantangmo, F., Ngouela, S., Kaiser, M., Tsamo, E., Anton, R., Weniger, B., 2007. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. J Ethnopharmacol 20, 111(1):8-12.

Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 1, 85-94.

Magalhães, A.F., Santos, C.C., Magalhães, E.G., Nogueira, M.A., 2002. Detection of polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* extracts by GC-MS of acetylated derivatives. Phytochem. Anal. 13.

Magalhães, A.F., Tozzi, A.M.G.A., Magalhães, E.G., Sannomiya, M., Soriano, M.D.P.C., Perez, M.A.F., 2007. Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro 79, 3, 351-367.

Mello, J.F., Lima, O.G., Albuquerque, M.M.F., Marini-bettolo, G.B., Lyra, F.D.A., Silva, E.C.S., Barron, J.S., Oliveira, E.L., 1974. O- and C-Prenylated chalcones with antibiotic and antineoplastic activity isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. Revista do Instituto de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 14, 1-2.

Menichini, F., Monache, D.F., Bettolo, G.B.M., 1982. Flavonoids and rotenoids from Tephrosieae and related tribes of leguminosae. Planta medica 45, 4.

de Mesquita, M.L., Grellier. P., Mambu L., de Paula J.E., Espindola L.S., 2007. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol.* 110, 1, 165-70. DOI: 10.1016/j.jep.2006.09.015

Moreira, L.C., Santana, C.F., Silva, I.N., 1973. In vitro study of the antineoplastic action of substances of microbial and plant origin against Ehrlich and sarcoma 180 carcinomas. *Revista do Instituto de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife*, 13, 1-2.

Muelas-Serrano, S., Nogal, J.J., Martínez-Díaz, R.A., Escario, J.A., Martínez-Fernández, A.R., Gómez-Barrio, A., 2000. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 101-7.

Nakamura, C.V., Santos, A.O., Vendrametto, M.C., Luize, P.S., Dias, B.P.F., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura T., 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 1, 61-66.

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 2009. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1335550488_Guia%20Para%20Vigil%C3%A2ncia,%20Preven%C3%A7%C3%A3o,%20Controle%20e%20Manejo.pdf Acesso em: 30 de novembro de 2016.

Osorio, E., Arango, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Gilménez, A., Robledo, S., 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of ethnopharmacology* 111, 3.

Paris, A.P., Persel, C., Serafin, C.F., Simão, R. C. G., Gandra, R. F., 2016. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. *Curr Microbiol*, 73, 878–884. DOI 10.1007/s00284-016-1135-4

Prakash, S., Ramasubburayan, R., Ramkumar, V.S., Kannapiran, E., Palavesam, A., Immanuel, G., 2016. In vitro—Scientific evaluation on antimicrobial, antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical constituents of traditional coastal medicinal plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 648–657.

Pizzolatti, M.G., Koga, A.H., Grisard, E.C., Steindel M., 2003. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, 10, 5, 422-6. DOI: 10.1078/0944-7113-00252

Rassi, J.A., Marin-neto, J.A., 2000. Cardiopatia chagásica crônica: estado da arte. *Rev Soc Cardiol São Paulo*, v. 10.

Traina, M., Meymandi, S., Bradfield, J.S., 2016. Heart Failure Secondary to Chagas Disease: an Emerging Problem in Non-endemic Areas. *Current Heart Failure Reports*. DOI 10.1007/s11897-016-0305-9.

Vieira, S. Bioestatística: tópicos avançados, 2003. Rio de Janeiro: Sindicato Nacional dos editores de livros.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 02 de dezembro de 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu concluir que:

Os testes qualitativos mostraram a presença de alcaloides, chalconas, cumarinas, triterpenos e saponinas nas raízes e nas sementes de *L. cultratus*, enquanto que flavonoides e esteroides somente nas raízes da mesma;

Os extratos de sementes e raízes de *L. cultratus* não apresentaram atividade antimicrobiana frente as cepas *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;

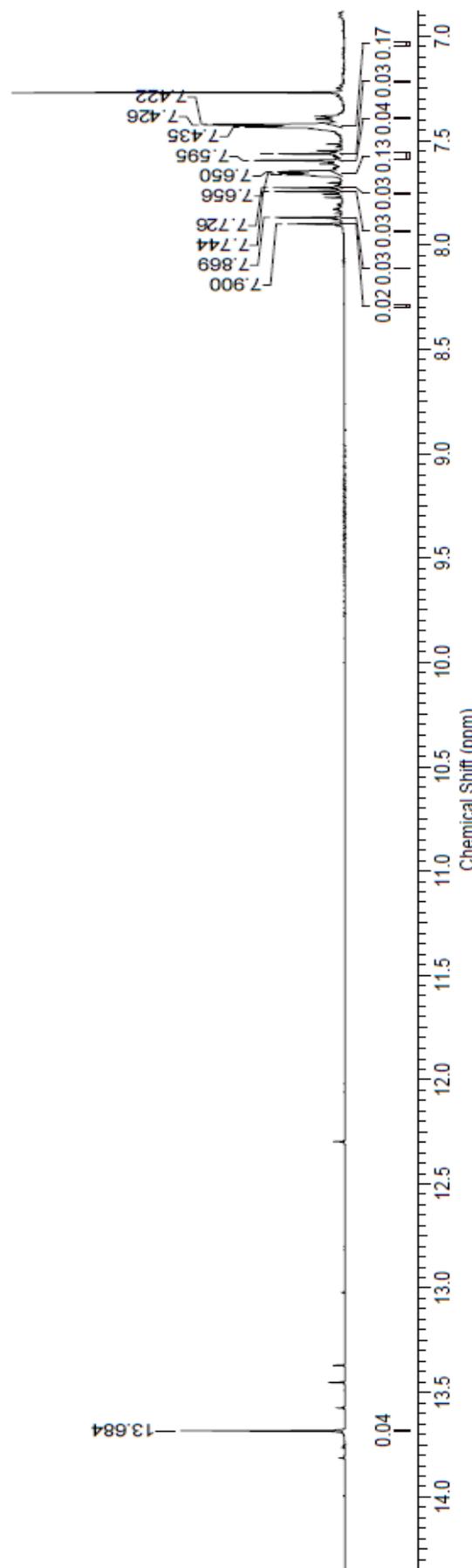
A avaliação dos extratos LHS, LDS e LMS por RMN ^1H (500MHz) sugere a presença de chalconas em LDS e LHS, e esteróides e terpenos em LMS;

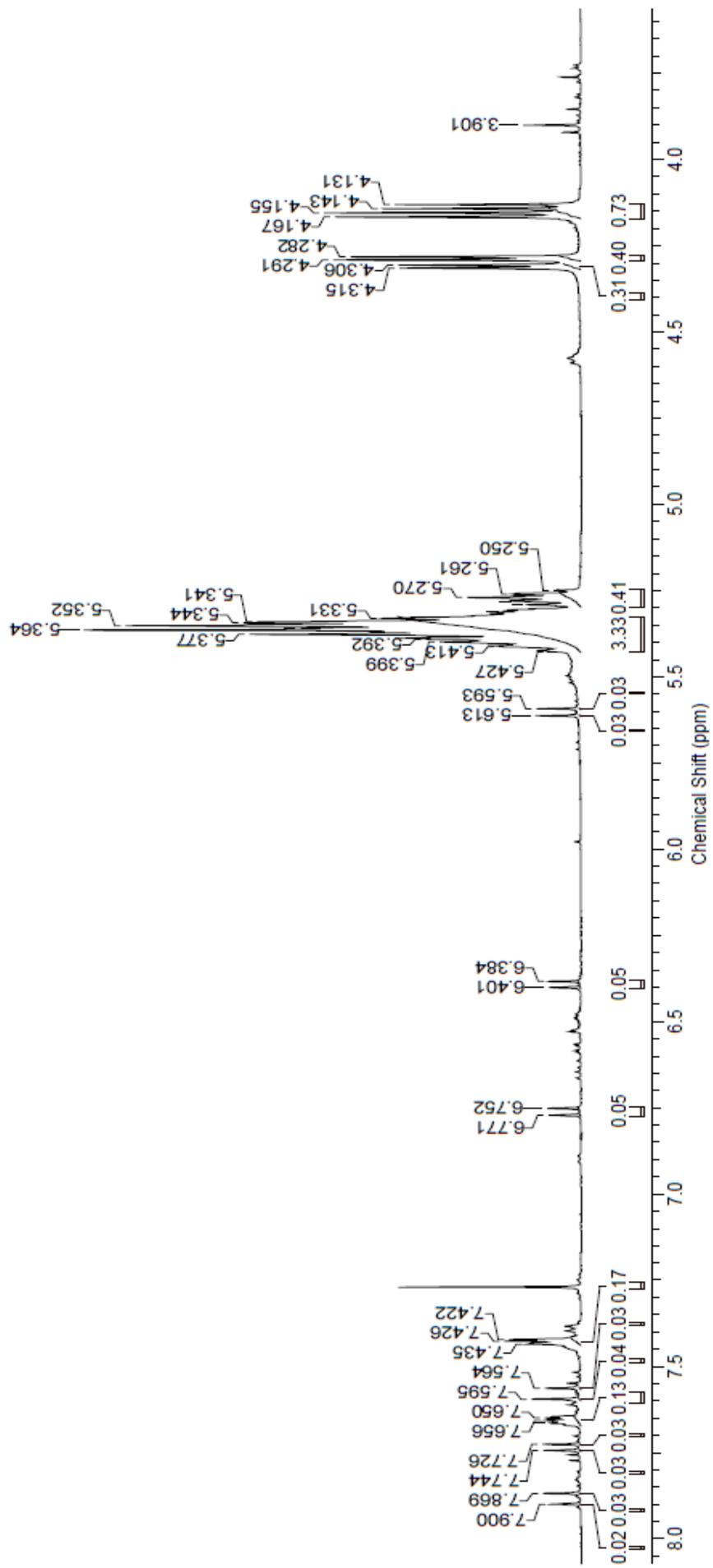
Os extratos LHS e LDS apresentam atividade antitripanosômica, sendo que LDS é mais ativo que LHS;

O teste de hemotoxicidade com os extratos das sementes mostrou que LDS, apesar de mais tóxico, não produz hemólise na concentração de CI_{50} anti-*T. cruzi* e apresenta melhor índice de seletividade em relação aos demais extratos;

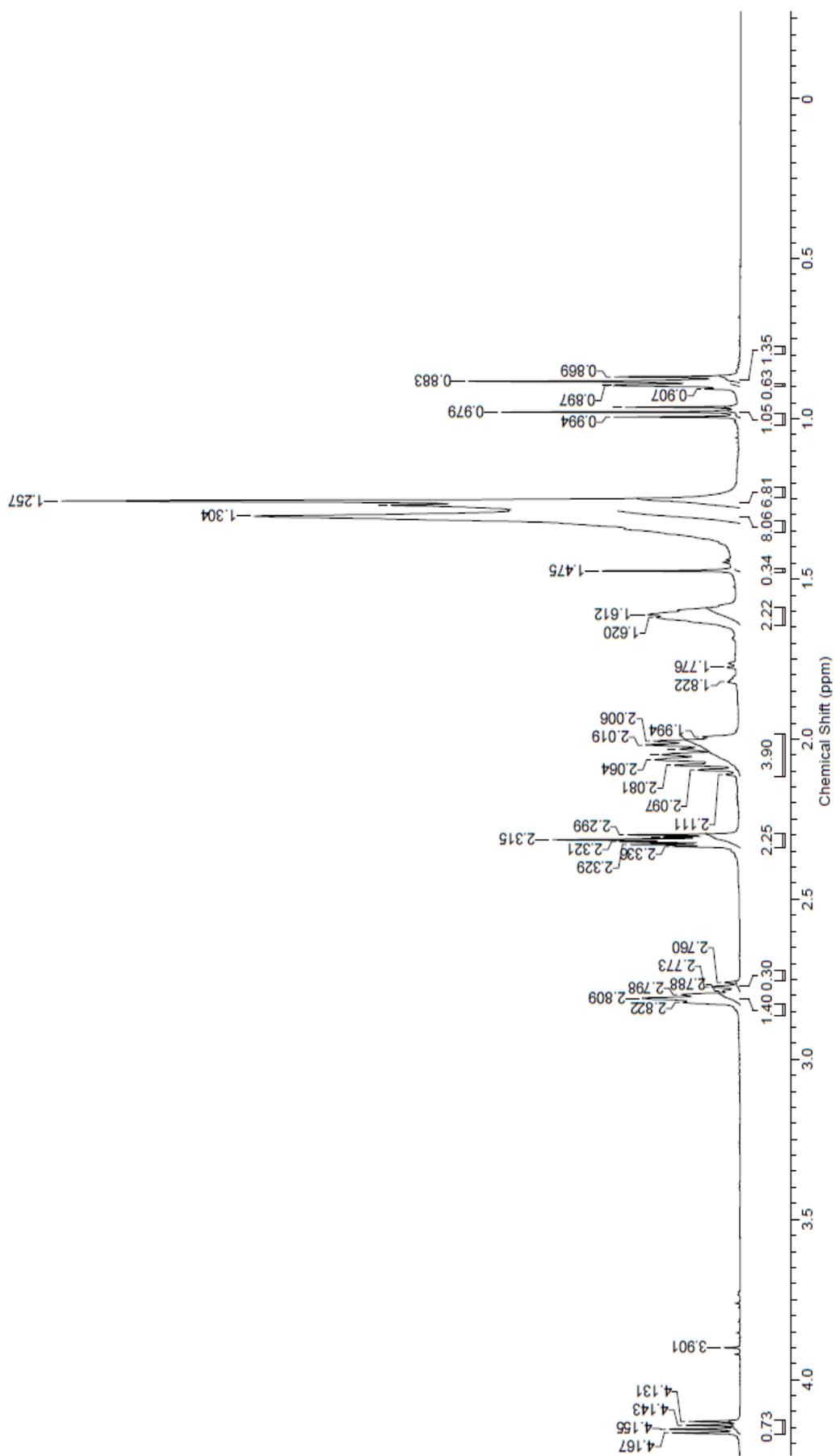
A espécie merece maiores estudos citotóxicos e investigações mais aprofundadas das atividades farmacológicas, principalmente em relação a ação antimicrobiana, reportada anteriormente na literatura científica, e não evidenciada no presente estudo. A caracterização e verificação das propriedades de seus constituintes também é uma promissora e importante linha de investigação.

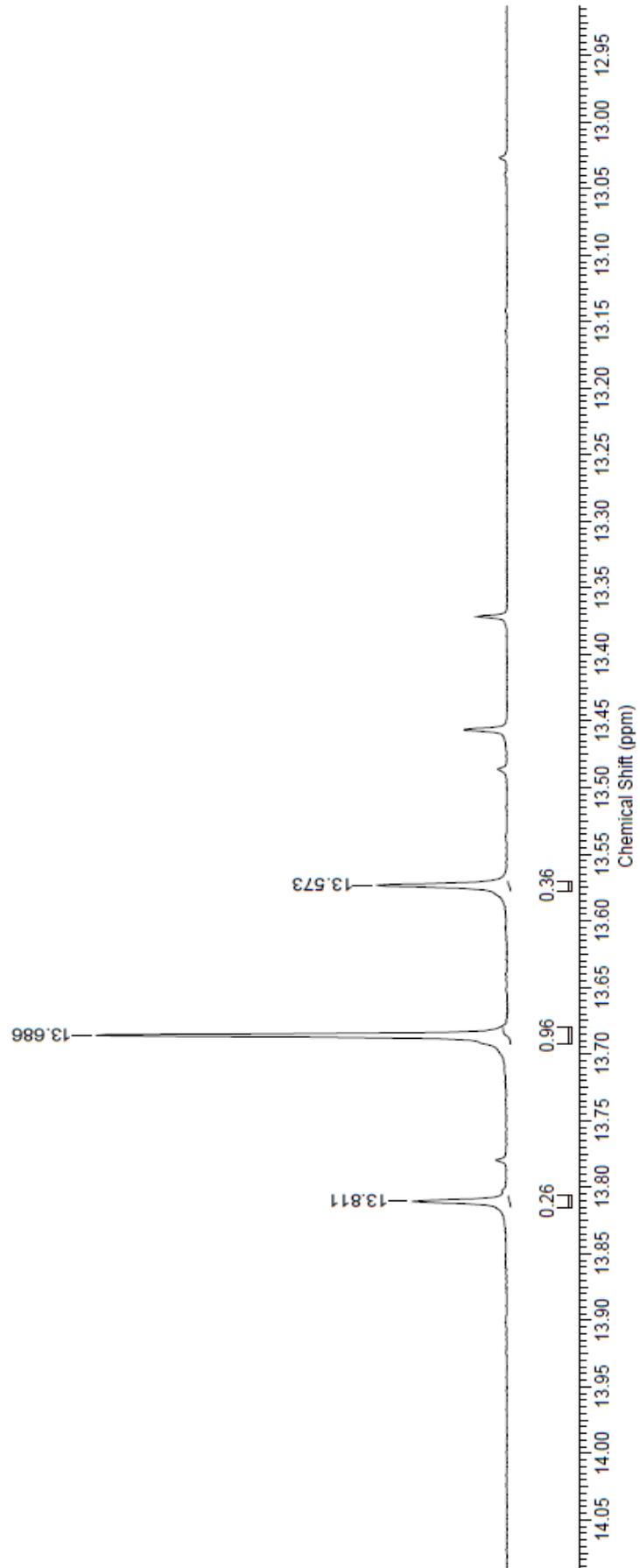
ANEXOS

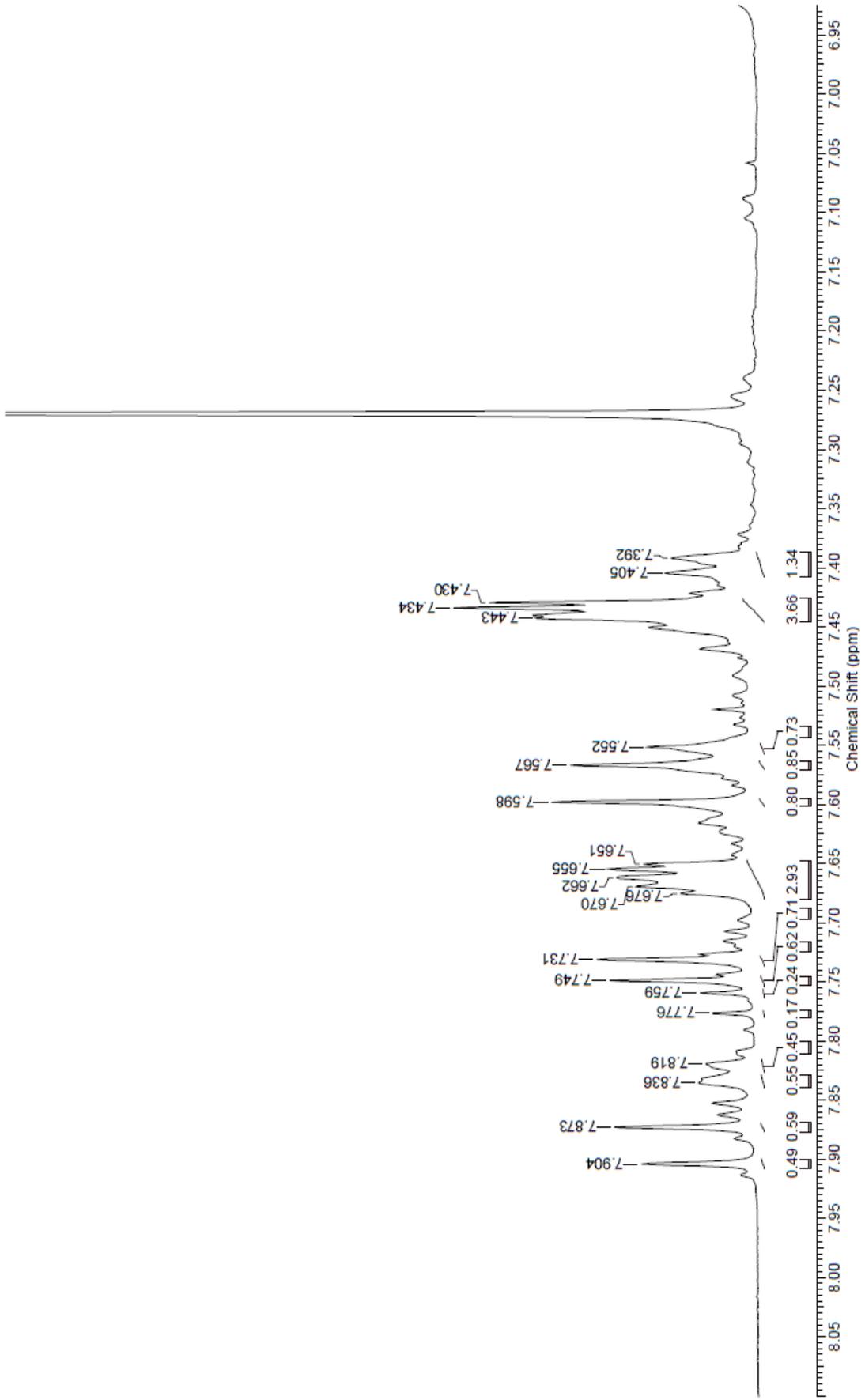
ANEXO 1: espectros de RMN ^1H de LHS (500MHz/ CDCl_3)Anexo 1A: Expansão do espectro de RMN ^1H de LHS (500MHz/ CDCl_3)

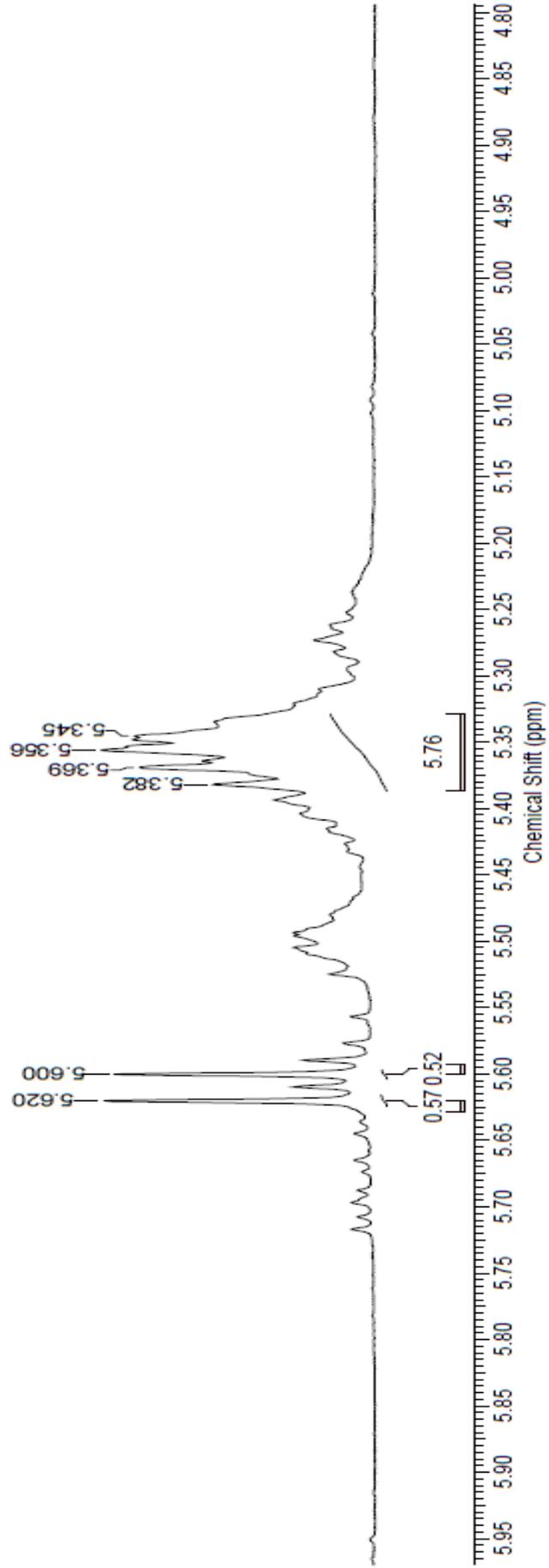


Anexo 1B: Expansão do espectro de RMN ^1H de LHS (500MHz/ CDCl_3)

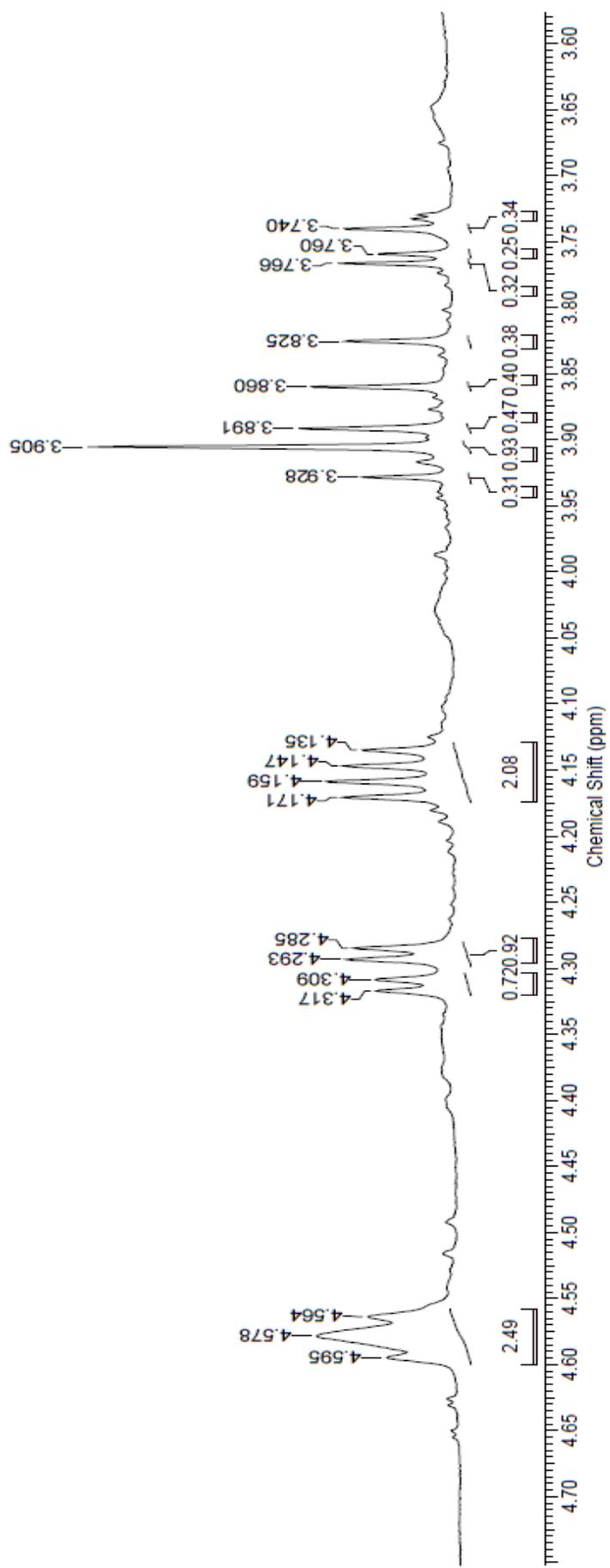
Anexo 1C: Expansão do espectro de RMN ^1H de LHS (500MHz/ CDCl_3)

ANEXO 2: espectros de RMN ^1H de LDS (500MHz/ CDCl_3)Anexo 2A: Expansão do espectro de RMN ^1H de LDS (500MHz/ CDCl_3)

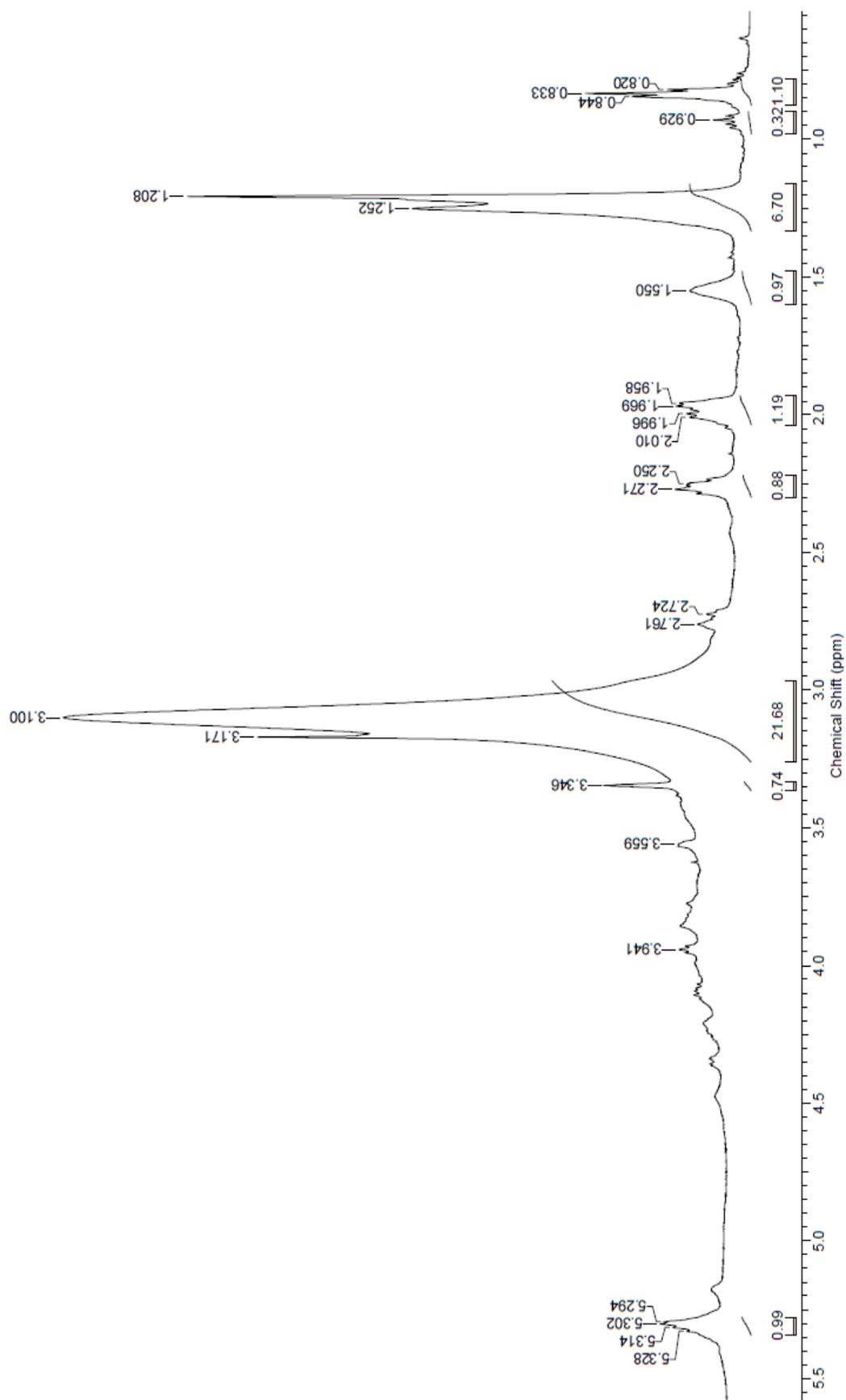
Anexo 2B: Expansão do espectro de RMN ^1H de LDS (500MHz/ CDCl_3)

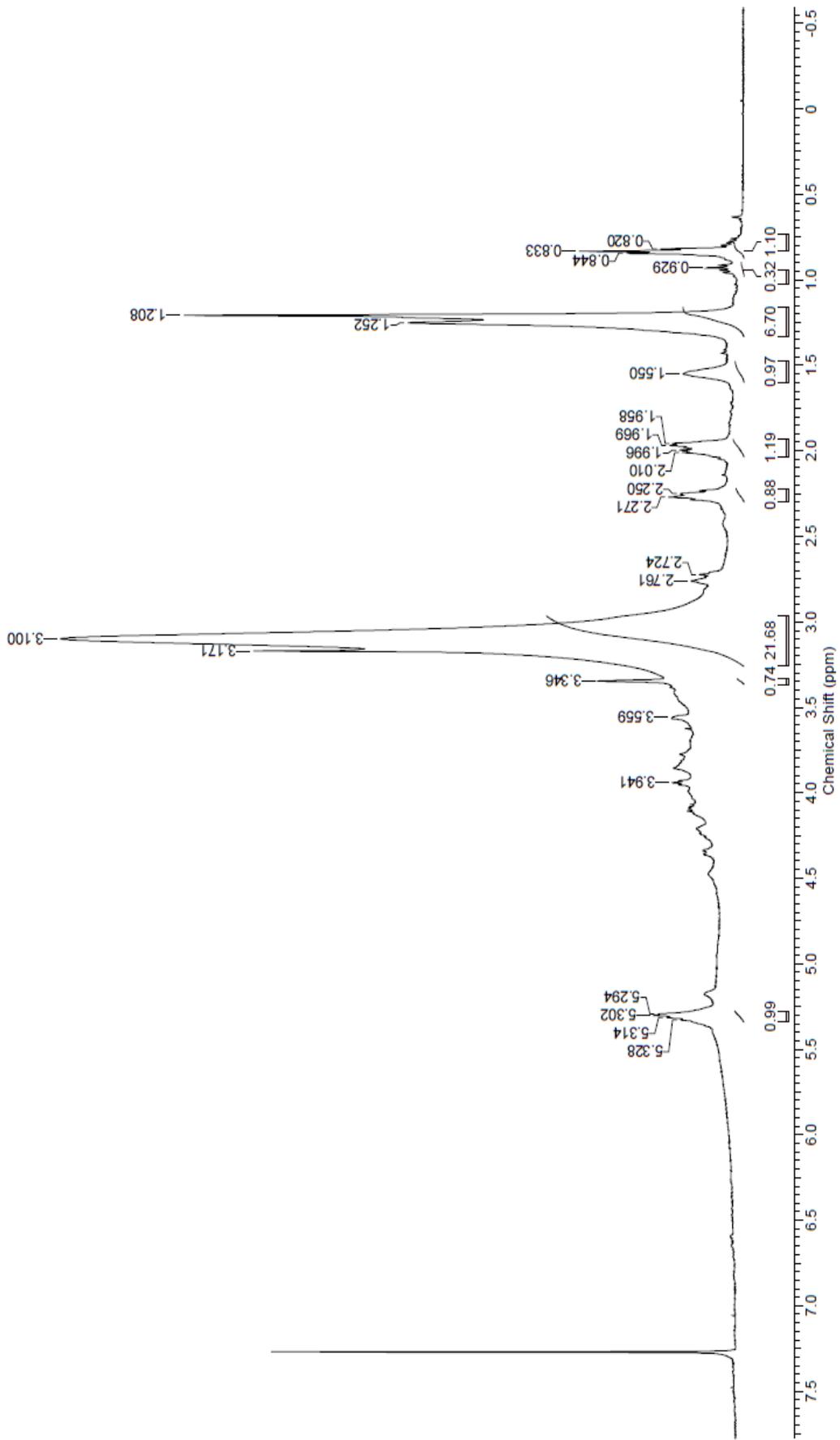


Anexo 2C: Expansão do espectro de RMN ^1H de LDS (500MHz/ CDCl_3)



Anexo 2D: Expansão do espectro de RMN ¹H de LDS (500MHz/ CDCl₃)

ANEXO 3: espectros de RMN ^1H de LMS (500MHz/ CDCl_3)Anexo 3A: Expansão do espectro de RMN ^1H de LMS (500MHz/ CDCl_3)

Anexo 3B: Expansão do espectro de RMN ^1H de LDMS (500MHz/ CDCl_3)