



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA – EFAR



LUCAS RESENDE DUTRA SOUSA

Avaliação in silico e in vitro da atividade anti-Trypanosoma cruzi de extratos oleosos de sementes de Moringa oleifera Lamarck

OURO PRETO – MG, 2020

LUCAS RESENDE DUTRA SOUSA

Avaliação *in silico* e *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos oleosos de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Márcia do Sacramento Melo

OURO PRETO – MG, 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S725a Sousa, Lucas Resende Dutra .

Avaliação in silico e in vitro da atividade anti-Trypanosoma cruzi de extratos oleosos de sementes de Moringa oleifera Lamarck. [manuscrito]

/ Lucas Resende Dutra Sousa. - 2020.

33 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira. Coorientadora: Profa.

Dra. Tânia Márcia do Sacramento Melo. Monografia (Bacharelado).

Universidade Federal de Ouro Preto.

Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia.

1. Chagas, Doença de. 2. Produtos Naturais. 3. Quimioterapia. I. Melo, Tânia Márcia do Sacramento. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Resende Dutra Sousa

Avaliação *in silico* e *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos oleosos de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 09 de dezembro de 2020

Membros da banca

Paula Melo de Abreu Vieira - Orientadora - Doutora- DECBI/Universidade Federal de Ouro Preto

Tânia Márcia do Sacramento Melo- Co-Orientadora - Doutora- DEQUI/Universidade Federal de Ouro Preto

Kátia da Silva Fonseca - Doutora - Centro Universitário Católica do Leste de Minas Gerais/UNILESTE

Luisa Helena Perin de Melo - Doutora - Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus GV

Paula Melo de Abreu Vieira, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 14/12/2020



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2020, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0114845** e o código CRC **7FC2F91A**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter se manifestado em cada momento, me concedendo força e sabedoria para trilhar o meu caminho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Paula Melo de Abreu Vieira pela confiança, disposição e oportunidades e à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Tânia Márcia do Sacramento Melo pelo apoio e conhecimentos transmitidos. Obrigado por terem acreditado na minha capacidade. Este trabalho é nosso!

À Prof^a. Dr^a. Viviane Martins Rebello dos Santos pelo incentivo e pela oportunidade de participar de diversos projetos de pesquisa em seu laboratório. Ao Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos por ser um excelente tutor e pelos ensinamentos acerca de formulações. À Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro e Prof^a. Dr^a. Marta de Lana por terem despertado em mim o interesse pela ciência. À Dr^a Kátia da Silva Fonseca por ter me ensinado a realizar ensaios de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. À Dr^a. Tatiane Roquete Amparo pela transmissão de conhecimentos a respeito de ensaios de citotoxicidade e à Dr^a. Janaína Brandão Seibert pela contribuição com os estudos de previsões de atividades biológicas. Agradeço a todos vocês pela disposição, paciência, pelos demais ensinamentos e sobretudo, pelo trabalho em equipe!

Aos amigos do Laboratório de Morfopatologia, Laboratório de Imunopatologia, Laboratório de Doença de Chagas e Laboratório de Produtos Naturais e de Síntese Orgânica, em especial, Aline Tonhela Ferraz, Thays Helena Chaves Duarte, Amanda Scofield de Azevedo, Mariana Yumi Domoto Nagaoka, Eleonora Lima Alves Cunha, Wanessa Aparecida da Silveira Almeida e Amanda dos Santos Antunes, por todas as conquistas, trocas de experiências e momentos de descontração. Vocês foram fundamentais para a minha formação e de certa maneira tornaram esta pesquisa possível e agradável!

Ao grupo PET Farmácia pelos momentos ímpares e experiência fornecida em projetos de ensino, pesquisa e extensão. As experiências que vivi com vocês possibilitaram uma melhor escrita do meu TCC!

Às demais pessoas que também contribuíram de alguma forma com este trabalho, especialmente, Amanda, Ana Clara, Ayron, Daniela, Gabriel, Gabriela, Isadora C., Isadora R., Izadora N., Jakeline, Jonathan, Juliana, Lourena, Marcelo, Marinna, Matheus, Mayke, Rodrigo e Thaís pelos momentos de alegria, aprendizado, companheirismo, ensinamentos de

convivência e pelo respeito. É muito bom saber que posso contar com vocês!

Aos meus pais, Agnaldo Dutra de Sousa e Adriana Marilda Resende, ao meu irmão Leandro Resende Dutra Sousa, à minha madrinha Marilândia Maia de Resende, ao meu tio Osvaldo José de Resende e aos demais familiares pelo incondicional apoio, amor, incentivo e inúmeras lições de vida. Eterno respeito e gratidão por todos os esforços que fizeram para ajudar a minha pessoa!

Por fim, agradeço à Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, a primeira da América Latina, pela inestimável formação e por permitir esta conquista!

“ Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender. ”

(Clarice Lispector)

RESUMO

A doença de Chagas, endêmica na América do Sul, América Central e México, tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, os únicos fármacos utilizados para o seu tratamento são o benznidazol e o nifurtimox, ambos com importantes efeitos adversos e variável eficácia terapêutica, principalmente na fase crônica da infecção, o que impulsiona a busca por novos tratamentos para a doença. As substâncias provenientes de produtos naturais são muito estudadas quanto às suas atividades biológicas, visto que podem ser utilizadas como princípios ativos de medicamentos. Entre os diversos produtos naturais, destaca-se a *Moringa oleifera* Lamarck, uma árvore nativa da Índia que possui diversos efeitos biológicos já relatados, inclusive, antiprotozoário. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade tripanocida de diferentes extratos de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. Para cumprir com o objetivo foram obtidos três extratos utilizando diferentes solventes orgânicos (hexano, diclorometano e etanol). A caracterização foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A partir dos compostos identificados por CG/EM, foi realizada a análise *in silico* pelo PASS, o que permitiu prever o potencial tripanocida de todas os compostos identificados. Posteriormente, determinou-se a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), a concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC₅₀) em formas epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e em formas amastigotas da cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*, por meio da capacidade dos extratos em matar a célula/parasito em diferentes concentrações. Ao final, o índice de seletividade (IS) foi calculado por meio da razão CC₅₀/IC₅₀. As análises *in silico* indicaram alta probabilidade para o efeito potencializador de permeabilidade da membrana para a maioria dos compostos identificados. Os extratos foram poucos citotóxicos e revelaram uma boa atividade frente às formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Em contrapartida, os resultados para amastigotas revelaram baixa ou nenhuma atividade para os extratos. O IS do extrato hexânico sobre a forma epimastigota foi maior que o do benznidazol. Por outro lado, o IS do benznidazol sobre a forma amastigota foi maior que o de todos os extratos, indicando o seu maior potencial sobre essa forma. Os resultados sugerem que o benznidazol ainda é a melhor substância com efeito tripanocida, entretanto, estudos relacionados ao desenvolvimento de nanoformulações com os extratos do presente trabalho seriam necessários para avaliar a possibilidade do seu uso em futuros tratamentos, visto que tal estratégia pode melhorar a performance de compostos ativos contra o *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: doença de Chagas; produtos naturais; quimioterapia.

ABSTRACT

Chagas disease, endemic in South America, Central America and Mexico, has the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* as its etiologic agent. Currently, the unique medicines used for its treatment are benznidazole and nifurtimox, both with important adverse effects and variable therapeutic efficacy, especially in the chronic phase of infection, which drives the search for new treatments for the disease. Substances from natural products are widely studied as to their biological activities, since they can be used as active ingredients in medicines. Among the natural products, *Moringa oleifera* Lamarck stands out, a tree native from India that has several biological effects already reported, including antiprotozoan. The objective of this work was to evaluate the trypanocidal activity *in silico* and *in vitro* of different extracts of *Moringa oleifera* Lamarck seeds. Three extracts were obtained using different organic solvents (hexane, dichloromethane and ethanol). The characterization was performed through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). According to the compounds identified by GC/MS, the *in silico* analysis was performed by PASS, which made it possible to predict the trypanocidal potential of all identified compounds. Subsequently, the cytotoxic concentration was determined for 50% of the cells (CC₅₀), the inhibitory concentration for 50% of the parasites (IC₅₀) in epimastigote form of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* and in amastigote form of the Tulahuen strain of *Trypanosoma cruzi*, through of the ability of the extracts to kill the cell/parasite in different concentrations. At the end, the selectivity index (SI) was calculated using the CC₅₀/IC₅₀ division. The *in silico* analyzes indicated high probability for the membrane permeability enhancing effect for most of the compounds identified. The extracts were few cytotoxic and showed good activity against the epimastigote form of *Trypanosmoa cruzi*. In contrast, the amastigote results revealed low or no activity for the extracts. The SI of the hexanic extract on the epimastigote form was higher than that of benznidazole. However, the benznidazole SI on the amastigote form was higher than all extracts, indicating its greatest potential on this form. The results suggest that benznidazole is still the best substance with a trypanocidal effect, however, studies related to the development of nanoformulations with the extracts of the present work would be necessary to evaluate the possibility of its use in future treatments, since such strategy can improve performance of active compounds against *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: Chagas disease; natural products; chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiologia da doença de Chagas.	1
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 3: Estrutura química do nifurtimox.	4
Figura 4: Estrutura química do benznidazol.	5
Figura 5: Exemplos de árvores da espécie <i>Moringa oleifera</i> Lam.	8
Figura 6: Exemplos de flores de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	9
Figura 7: Estrutura química do etil oleato.	19
Figura 8: Estrutura química do ácido hexadecanoico.	19
Figura 9: Estrutura química do 9-octadecenal (Z).	20
Figura 10: Estrutura química do ácido 6-octadecenoico.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de CG/EM utilizadas para análise dos extratos de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	13
Tabela 2: Rendimento do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	17
Tabela 3: Compostos voláteis identificados no extrato hexânico e diclorometânico de sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. por CG/EM.....	18
Tabela 4: Previsões <i>in silico</i> dos compostos identificados do extrato hexânico e do extrato diclorometânico das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando o PASS.....	23
Tabela 5: Atividade tripanocida do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico em formas epimastigotas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> , citotoxicidade em fibroblastos de murinos da linhagem L929 e índice de seletividade.	25
Tabela 6: Atividade tripanocida do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico em formas amastigotas da cepa Tulahuen do <i>Trypanosoma cruzi</i> , citotoxicidade em fibroblastos de murinos da linhagem L929 e índice de seletividade.....	26

LISTA DE SIGLAS

CC₅₀	Concentração citotóxica para 50%.
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
CL₅₀	Concentração letal para 50%.
CPRG	Vermelho de clorofenil-β-d-galactopiranosídeo.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
IC₅₀	Concentração inibitória para 50%.
IgG	Imunoglobulina G.
IgM	Imunoglobulina M.
IS	Índice de seletividade.
k-DNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto.
Lam.	Lamarck.
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
LIT	Triptose de infusão hepática.
MoFTI	Inibidor de tripsina proteica.
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
OMS	Organização Mundial de Saúde.
Pa	Probabilidade de o composto ser ativo.

PASS	Espectros de Predição de Atividade de Substâncias
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico.
Pi	Probabilidade de o composto ser inativo.
PO	Peso do óleo.
PT	Peso da torta.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> .

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1 A doença de Chagas	1
1.2 Tratamento da doença de Chagas	3
1.3 Novas alternativas: produtos naturais	7
1.4 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck	8
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1 Extração do óleo das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. e cálculo do rendimento	13
4.2 Identificação dos compostos voláteis nos extratos obtidos - Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	13
4.3 Avaliação dos potenciais efeitos biológicos <i>in silico</i> sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
4.4 Determinação da concentração citotóxica para 50% das células hospedeiras de <i>Trypanosoma cruzi</i> – Fibroblastos de murinos L929	14
4.5 Atividade tripanocida em epimastigotas	15
4.6 Atividade tripanocida em amastigotas	15
4.7 Índice de Seletividade (IS)	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Obtenção e rendimento do extrato hexânico, extrato diclorometânico e do extrato etanólico	17
5.2 Identificação dos compostos voláteis presentes no extrato hexânico, no extrato diclorometânico e no extrato etanólico - Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	17
5.3 Avaliação dos potenciais efeitos biológicos <i>in silico</i> sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
5.4 Citotoxicidade, atividade tripanocida e índice de seletividade	24
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana é uma doença negligenciada que possui como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Atualmente é endêmica na América Latina, na América Central e no México, além de ter expandido para áreas não endêmicas como Austrália, Canadá, Espanha, Estados Unidos, França, Japão e outros países asiáticos através da migração de pessoas infectadas (**Figura 1**). Nas áreas endêmicas é transmitida principalmente pelo vetor (triatomíneos hematófagos) quando as fezes e urina contendo formas tripomastigotas metacíclicas entram em contato com superfícies corporais lesionadas ou com mucosas e por via oral quando ocorre a ingestão de alimentos como açaí e caldo de cana que contenham formas infectantes do parasito. Nos países não endêmicos, o parasito é transmitido por maneiras que não dependem do vetor como compartilhamento de seringas, acidentes laboratoriais, transfusões sanguíneas, transmissão congênita e transplante de órgãos (COURA; JUNQUEIRA, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WHO, 2019; YAMAGATA; NAKAGAWA, 2006).

Figura 1: Epidemiologia da doença de Chagas.

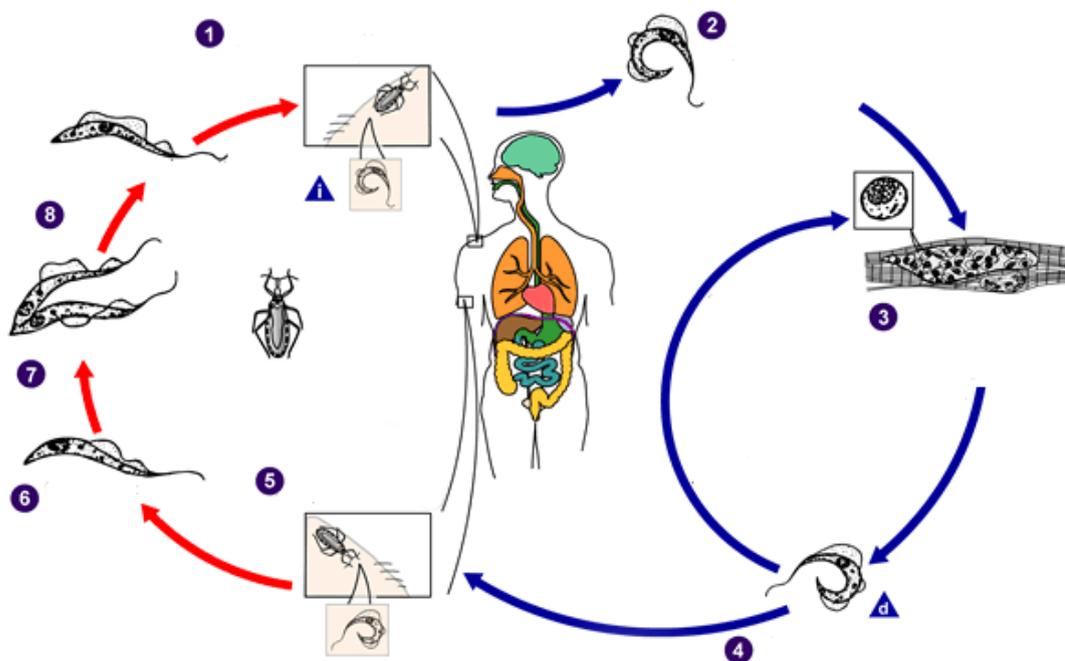


Fonte: DNDi América Latina, 2020.

O ciclo de vida do parasito (**Figura 2**) se estabelece quando o hospedeiro invertebrado infectado ao se alimentar de sangue, libera pelas fezes as formas tripomastigotas metacíclicas que penetram no hospedeiro vertebrado. Essas formas, invadem os fagócitos mononucleares e

escapam de seus mecanismos de destruição, se diferenciando em amastigotas no citoplasma dessas células. As formas amastigotas replicam-se por divisão binária no citoplasma das células hospedeiras e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas que promovem ruptura celular e vão para o sistema circulatório. As tripomastigotas sanguíneas possuem alto potencial para infectar qualquer célula que possui núcleo e também para infectar o hospedeiro invertebrado, ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado contendo tais formas. As formas circulantes, ao serem ingeridas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor e no intestino posterior, o parasito se diferencia em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (CALIXTO, 2003; CHAGAS, 1909; DE MELLO et al., 2016; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



1: as formas tripomastigotas metacíclicas provenientes do vetor penetram no hospedeiro vertebrado. 2: as formas tripomastigotas metacíclicas invadem células, onde diferenciam-se nas formas amastigotas. 3: as formas amastigotas replicam-se por divisão binária no citoplasma das células hospedeiras e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas que promovem ruptura celular e vão para o sistema circulatório ou infectam outras células. 4: as formas tripomastigotas sanguíneas infectam células de diversos tecidos e se diferenciam em amastigotas intracelulares. 5: o inseto vetor pode ser infectado. 6: as formas circulantes, ao serem ingeridas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7: as formas epimastigotas também se multiplicam por divisão binária. 8: no intestino posterior o parasito, tais formas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes. i: estágio infeccioso; d: estágio diagnóstico.

Fonte: Adaptado de CDC, 2011.

Estabelecida a infecção, inicia-se a fase aguda da doença de Chagas. Tal fase, caracteriza-se por apresentar parasitemia patente, ou seja, presença de tripomastigotas no sangue do paciente. A fase aguda apresenta sintomas que podem se confundir com os de outras doenças infecciosas, bem como: febre, edema, mialgia e hipertrofia de linfonodos por exemplo. Ainda, sinais de porta de entrada podem ocorrer no indivíduo que está nessa fase da infecção, caso o paciente seja infectado pela via vetorial clássica, são eles: Sinal de Romaña (edema bipalpebral) e chagoma de inoculação (edema subcutâneo). Após a instalação da resposta imune do hospedeiro, a fase aguda evolui para a fase crônica da qual observa-se queda de anticorpos IgM e elevação de IgG. Essa fase é caracterizada por uma parasitemia subpatente, ou seja, o *Trypanosoma cruzi* encontra-se no interior de células musculares. Em raros momentos, o parasito é encontrado na corrente sanguínea, necessitando de métodos indiretos para a detecção da doença. A maioria dos pacientes apresentam a forma clínica indeterminada (60,0%) onde não se observa sintomas específicos. Em cerca de 30,0 a 40,0% dos casos, os indivíduos podem apresentar cardiomiopatia, arritmias, megacolon, megaesôfago, polineuropatia e acidente vascular cerebral (NEVES, DAVID PEREIRA; DE MELO, ALAN LANE; LINARDI, PEDRO MARCOS; VITOR, 2005; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; PRATA, 2001; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Atualmente, o conhecimento a respeito da doença de Chagas se expandiu em diversos aspectos. No entanto, muitos desafios ainda permanecem sem solução, visto que o controle epidemiológico, métodos de diagnóstico, terapêutica e prognóstico da doença precisam ser aprimorados em diferentes aspectos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

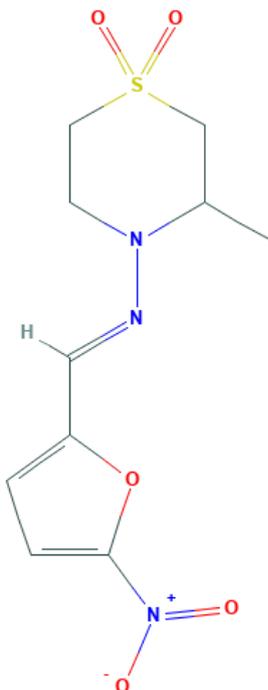
1.2 Tratamento da doença de Chagas

Passados 40 anos da descoberta da doença de Chagas é que foram descobertos dois medicamentos para o tratamento da infecção: benznidazol e nifurtimox. Ambos possuem inadequado perfil de segurança e eficácia e apenas o primeiro é disponibilizado para o tratamento no Brasil. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as características necessárias para que um fármaco seja considerado ideal são: apresentar cura parasitológica na fase aguda e na fase crônica da doença de Chagas; estabelecer eficácia terapêutica em dose única ou poucas doses de medicamento; ter baixo custo e ser de fácil aquisição; não possuir fácil indução de resistência; não apresentar efeitos adversos e não apresentar efeitos

teratogênicos (COURA; DE CASTRO, 2002; COURA; DIAS, 2009; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WHO, 2019).

O nifurtimox (**Figura 3**) foi o primeiro medicamento usado para o tratamento da doença de Chagas. É um fármaco derivado do 5-nitrofurfurilideno que produz radicais nitro-aniônicos. Esses radicais lesam o *Trypanosoma cruzi* na presença de oxigênio, o que faz com que esse fármaco possua grande atividade tripanocida. Entretanto, tal atividade ainda não é o suficiente para alcançar a eficácia desejada. As taxas de cura na fase crônica e indeterminada são de cerca de 86,0% em crianças de 7 a 14 anos de idade e de apenas 8,0% em adultos. Além disso, observa-se com uma frequência de 43,0 a 97,5% uma gama de efeitos adversos, são eles: anorexia, perda de peso, irritabilidade, insônia, desorientação, alterações de humor, parestesias, neuropatia periférica, náuseas, vômitos, febre e erupção cutânea. Devido à possibilidade do aparecimento de tais efeitos adversos, o tratamento é interrompido em 14,5 a 75,0% dos casos (COURA; DE CASTRO, 2002; COURA; DIAS, 2009; ESPUELAS et al., 2012; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 3: Estrutura química do nifurtimox.

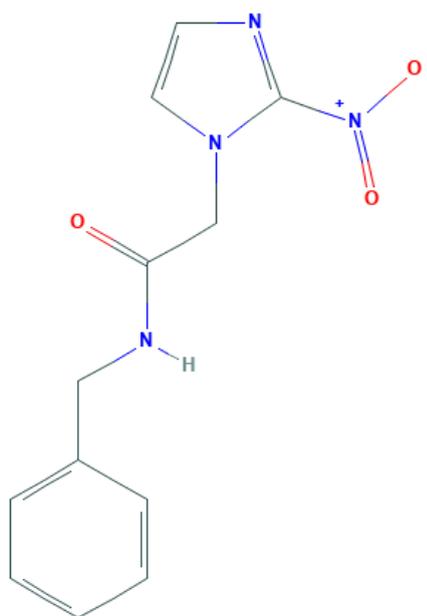


Fonte: PUBCHEM, 2020.

O benznidazol (**Figura 4**) é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da

doença de Chagas, visto que apresenta menos efeitos adversos e melhor perfil de tolerabilidade que o nifurtimox, além de ter melhores propriedades farmacocinéticas em níveis de órgãos e células. É um fármaco derivado dos nitroimidazóis que não possui mecanismo de ação totalmente elucidado. Sabe-se que tal mecanismo está relacionado com a nitroredução do fármaco e à ligação de seus metabólitos ao DNA nuclear, ao k-DNA, às proteínas e lipídeos do *Trypanosoma cruzi*. Durante a fase aguda da infecção, o benznidazol possui sucesso terapêutico de 76,0 a 100,0% dos casos, porém, a doença não é frequentemente diagnosticada durante essa fase, em virtude da sua sintomatologia inespecífica. Ainda, o sucesso terapêutico diminui durante a fase crônica da doença: em crianças de até 13 anos está entre 60,0 e 93,0% e em adultos com a doença crônica tardia é de 2,0 a 40,0%. Assim como o nifurtimox, o benznidazol também possui importantes efeitos adversos que levam ao abandono do tratamento em cerca de 9,0 a 29,0% dos casos. Os efeitos adversos mais observados em pacientes portadores da doença de Chagas são: hipersensibilidade (principalmente erupção cutânea), intolerância digestiva, anorexia, astenia, dor de cabeça, distúrbios do sono, neuropatia e depressão do sistema imune em consequência da depressão da medula óssea (COURA; DE CASTRO, 2002; COURA; DIAS, 2009; COURA; JUNQUEIRA, 2015; ESPUELAS et al., 2012; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 4: Estrutura química do benznidazol.



Fonte: PUBCHEM, 2020.

A variável eficácia terapêutica do tratamento da doença de Chagas está intimamente relacionada com a infecção ocorrer por distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*, tendo em vista que diferentes cepas do parasito possuem variados perfis de resistência aos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença. Um estudo de Filardi e Brener (1987) relatou a sensibilidade de 47 cepas de *Trypanosoma cruzi* frente ao nifurtimox e ao benznidazol. Nesse estudo, os autores infectaram camundongos com as diversas cepas e observaram eficácias terapêuticas entre 0 e 100%. As cepas que infectaram animais com taxas de cura que variaram 0 a 33% foram consideradas resistentes, parcialmente resistentes as cepas que infectaram os camundongos com de 33 a 66% de taxa de cura e sensíveis as que infectaram camundongos com taxas de cura que variaram entre 66 e 100% (FILARDI; BRENER, 1987). Outro estudo, relacionado a resistência e suscetibilidade das cepas Y e Tulahuen do *Trypanosoma cruzi* ao estresse oxidativo, relevou diferenças entre tais cepas, o que reforça a variada taxa de cura entre pacientes portadores da doença de Chagas (MIELNICZKI-PEREIRA et al., 2007).

A avaliação de cura do indivíduo portador da doença de Chagas envolve saber se houve cura parasitológica (eliminação total dos parasitos da corrente sanguínea e dos tecidos) e cura clínica (eliminação total dos sinais e sintomas). Devido à falta de marcadores de cura e de progressão da infecção, diminui-se o estímulo para continuidade do tratamento da doença, principalmente por parte dos médicos que acompanham os pacientes infectados (COURA; DE CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Vários fatores estão envolvidos com os problemas relacionados à doença de Chagas, entre eles: saúde pública, falta de marcadores precoces, fatores científicos, econômicos, educacionais, políticos e tratamento disponível. Em relação ao tratamento, destaca-se a necessidade de novos medicamentos com menos efeitos adversos, aumento de atividade tripanocida e com menor custo, visto que os dois fármacos disponíveis não são totalmente eficazes e demonstram importantes efeitos adversos. Entretanto, ocorre falta de investimento em novas terapias para a doença de Chagas, principalmente por parte da indústria farmacêutica, por se tratar de uma doença negligenciada que remete em sua maior parte à uma população debilitada do ponto de vista socioeconômico (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Apesar do cenário exposto, há uma grande perspectiva em relação às novas opções de tratamento, principalmente em relação à pesquisa de substâncias provenientes de produtos

naturais, uma vez que representam uma enorme fonte de substâncias que podem possuir elevada atividade contra protozoários (SALEM; WERBOVETZ, 2006).

1.3 Novas alternativas: produtos naturais

A pesquisa por novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas é essencial, tendo em vista que o tratamento atual oferece baixa tolerância e eficácia, especialmente durante a fase crônica da infecção. Dentre as alternativas, estão os produtos de origem natural, que representam cerca de 40% dos produtos farmacêuticos do atual mercado, além de muitos ainda não possuírem avaliações quanto a sua potencial atividade contra protozoários (CALIXTO, 2003; COURA; DE CASTRO, 2002; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; DA SILVA et al., 2013; SALEM; WERBOVETZ, 2006).

Os produtos naturais são importantes fontes de agentes farmacológicos, inclusive, muitos são usados para o tratamento de doenças infecciosas. Porém, a indústria farmacêutica se afastou da pesquisa de produtos de origem natural para focar em pesquisas relacionadas à química combinatória, na tentativa de aumentar a produtividade de novos medicamentos. Essa abordagem não resultou no aumento de tal produtividade, uma vez que o número de pedidos de novos medicamentos diminuiu depois da adoção dessas medidas, o que enfatiza a importância retomada de pesquisas com produtos de origem natural para o desenvolvimento de novos fármacos (SALEM; WERBOVETZ, 2006).

Para ocorrer o desenvolvimento de novos fármacos, importantes etapas devem ser consideradas, são elas: isolar ou sintetizar o composto a ser testado; avaliar a atividade biológica em por meio de testes *in vitro* e *in vivo*; identificar as diferenças entre o parasito e o hospedeiro; fazer a relação estrutura-atividade da substância isolada ou sintetizada objetivando melhorar parâmetros farmacocinéticos; fazer estudos estruturais e realizar a produção de compostos com variadas estruturas químicas (COURA; DE CASTRO, 2002).

Após o isolamento da substância a ser testada, em conseguinte tem-se a etapa de avaliação da atividade biológica *in vitro*. Para a determinação de tal atividade foram feitos estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas, os quais determinam critérios para realização desses estudos. Os critérios englobam: definir a linhagem celular, a cepa e a forma evolutiva do *Trypanosoma cruzi*; fazer a automatização dos procedimentos; determinar a IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50,0% dos parasitos) e o IS (índice de seletividade) da

substância testada e do benzimidazol. Caso a seletividade determinada seja maior ou igual a 50, estimula-se a continuidade com estudos *in vivo* (ROMANHA et al., 2010).

1.4 *Moringa oleifera* Lamarck

A *Moringa oleifera* Lam. (**Figura 5**), também conhecida como moringa, quiabo de-quina, lírio, rabanete picante, acácia-branca, árvore-rabanete-de-cavalo, cedro e como moringueiro, é uma planta medicinal e comestível que pertence à família Moringaceae. É uma árvore nativa do norte da Índia que cresce em diversos países tropicais e subtropicais devido à sua capacidade de resistência à longos períodos de seca, além de possuir fácil e rápido crescimento. Muitas partes da árvore (raiz, casca, goma, folha, fruto, flores, sementes e óleo das sementes) são usadas para tratar diversos tipos de doenças na Índia (ABDULKARIM et al., 2005; JANG et al., 2008; PADAYACHEE; BAIJNATH, 2019).

Figura 5: Exemplos de árvores da espécie *Moringa oleifera* Lam.



Fonte: SEMENTES CAIÇARA, 2020.

Foram descritas diferentes atividades farmacológicas da *Moringa oleifera* Lam., entre elas: antimicrobiana, hipotensora, hipoglicêmica, imunomodulatória, anti-inflamatória e recentemente, atividade antiprotozoária. Suas folhas são usadas como uma alternativa natural de eliminação de vermes intestinais, bem como a sua casca como anti-inflamatório. Ainda, diferentes partes dessa planta são usadas para a extração de compostos fitoquímicos (alcaloides, taninos, flavonoides, carotenoides, antraquinonas, antocianinas e proantocianidinas), que

contribuem para o tratamento de doenças de populações de países em desenvolvimento (GOYAL et al., 2007; PADAYACHEE; BAIJNATH, 2019).

Recentemente foi relatado que o extrato aquoso da flor de *Moringa oleifera* Lam. (**Figura 6**) reduziu o número das formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* em todas as concentrações testadas, mostrando que a concentração que lisou 50% das tripomastigotas após 24 h foi de 54,18 µg/mL. O extrato apresentou atividade inibidora de tripsina específica. Tal atividade está ligada à presença do inibidor de tripsina proteica (MoFTI). O MoFTI também promoveu a lise de tripomastigotas, apresentando concentração letal para 50% dos parasitos (CL₅₀) de 41,20 µg/mL. Esse valor foi inferior ao determinado para o extrato de flor, sugerindo que o MoFTI é o principal princípio ativo. Em um estudo semelhante, foi constatado que a incubação de MoFTI levou à lise de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, uma vez que o número de células do parasito contadas nos tratamentos com MoFTI foi menor do que no controle negativo do estudo. Após 24 h, o valor de CL₅₀ constatado foi de 43,5 µg/mL. Nesse mesmo trabalho, foi investigado o efeito do MoFTI na viabilidade de células humanas. Após 24, 72 e 120 h, foi revelado que o MoFTI não afetou a capacidade dessas células para metabolizar o MTT, em comparação com o controle negativo do estudo. Portanto, foi assumido que, nas condições utilizadas, o MoFTI não foi tóxico para as células humanas. Foi observado um número significativamente maior de células viáveis em tratamento com o inibidor a 15,62 µg/mL, em comparação com o número de células do controle negativo, sugerindo que MoFTI induziu proliferação celular após exposição por 24 h (NOVA et al., 2020; PONTUAL et al., 2018).

Figura 6: Exemplos de flores de *Moringa oleifera* Lam.



Fonte: PROJETO VERDE, 2015.

As protozooses, como a doença de Chagas, geralmente ocorrem em países tropicais ou subtropicais que estão em desenvolvimento. Além do extrato aquoso da flor de *Moringa oleifera*, que apresentou um potencial tripanocida, destaca-se a necessidade de estudar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos orgânicos de outras partes da planta. Comprovando-se tal atividade, a *Moringa oleifera* Lam. poderia ser utilizada como estratégia profilática/quimioterápica de baixo custo, uma vez que oferece fácil acesso e que possui ótimo crescimento nessas regiões (PADAYACHEE; BAIJNATH, 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas (benznidazol e nifurtimox) possuem variável eficácia terapêutica (principalmente na fase crônica da infecção), um grande número de efeitos adversos e, ainda, falta de interesse das indústrias farmacêuticas para combater tal doença, enfatiza-se a necessidade de buscar novos compostos ativos contra o *Trypanosoma cruzi*. Nesse sentido, a utilização de extratos oleosos provenientes das sementes da moringa pode vir a ser uma opção de tratamento via produtos naturais com potencial tripanocida, uma vez que já foi relatada a atividade inibidora de tripsina específica do extrato aquoso das flores da moringa. Ressalta-se que a árvore de *Moringa oleifera* Lam. possui ótimo crescimento em regiões tropicais e subtropicais, que as suas sementes são produzidas de forma relativamente rápida e que o processo de obtenção dos extratos orgânicos já são procedimentos bem estabelecidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade tripanocida *in silico* e *in vitro* de diferentes extratos oleosos de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair os óleos das sementes utilizando hexano, diclorometano e etanol como solventes e calcular o rendimento dos diferentes extratos;
- Identificar os compostos voláteis dos diferentes extratos;
- Avaliar os possíveis efeitos biológicos *in silico* das substâncias identificadas sobre o *Trypanosoma cruzi*;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos hexânico, diclorometânico e do etanólico;
- Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* dos extratos contra formas epimastigotas;
- Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* dos extratos contra formas amastigotas;
- Calcular o Índice de Seletividade dos extratos.

4. METODOLOGIA

4.1 Extração do óleo das sementes de *Moringa oleifera* Lam. e cálculo do rendimento

A compra das sementes de *Moringa oleifera* Lam. foi realizada no dia 3 de abril de 2019 na empresa Arbocenter. As sementes adquiridas provêm da cidade de Araçatuba – SP da safra 2019 (31/01/2019) latitude 20°56'19.72" S e longitude 50°40'6.17".

As sementes foram beneficiadas, separando-se as sementes das cascas e impurezas. Em seguida as sementes foram trituradas e secas em estufa até ter peso constante. As extrações do óleo de *Moringa oleifera* Lam. foram realizadas em aparelho extrator Soxhlet utilizando diferentes solventes orgânicos (hexano, diclorometano e etanol) por um período de 8 h cada extração. Após as extrações, o solvente foi rotaevaporado e os diferentes extratos foram obtidos. Para calcular os rendimentos das extrações, foi utilizada a **Equação 1**.

$$\text{Equação 1: Rendimento} = (\text{PO} \times 100) / \text{PT}$$

PO: Peso do óleo; PT: Peso da torta.

4.2 Identificação dos compostos voláteis nos extratos obtidos - Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As amostras foram solubilizadas em hexano, acetado de etila ou metanol, de acordo com a solubilidade de cada uma. Em seguida foram analisadas utilizando cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, GC-MSD 5975, Agilent®, com as condições de análise apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Condições de CG/EM utilizadas para análise dos extratos de *Moringa oleifera* Lam.

Equipamento	GC-MSD 5975, Agilent®
Coluna cromatográfica	Coluna capilar HP-5MS 5% Fenil Metil Silox (30 m X 250 µm X 0,25 µm)
Gás de arraste; vazão	Hélio; 1,4 mL/min
Modo de injeção	Splitless
Volume injetado	1 µL

Temperatura do injetor	290 °C
Temperatura da coluna	100 °C por 1 min, 5 °C/min até 200 °C, 10 °C/min até 290 °C, 290 °C por 10 min
Temperatura do detector	290 °C
Impacto eletrônico	70 eV
Tempo de corrida	40 min

Os compostos detectados foram identificados utilizando o software MSD *Chemstation*[®] acoplado com a biblioteca de espectros de massa NIST/2.0 (*National Institute of Standards and Technology - Standard Reference Database*).

4.3 Avaliação dos potenciais efeitos biológicos *in silico* sobre o *Trypanosoma cruzi*

Os compostos identificados por meio da CG/EM de cada extrato obtido a partir de sementes de *Moringa oleifera* Lam. foram analisados *in silico* utilizando a ferramenta PASS (Prediction Activity Spectra of Substances). Tal ferramenta possibilita analisar diversos efeitos farmacológicos e mecanismos de ação com base na estrutura química dos compostos e também permite comparações com substâncias que já possuem atividades cientificamente comprovadas. Os resultados das análises no PASS são fornecidos como probabilidade de o composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi).

Visando avaliar o potencial para a atividade tripanocida dos constituintes identificados, foram analisados os resultados de Pa e Pi para os efeitos biológicos: antiparasitário; antiprotozoário; antiprotozoário (*Trypanosoma*); potencializador da atividade antiparasitária; potencializador de permeabilidade da membrana; inibidor de biossíntese de parede celular; inibidor da síntese de colesterol; regulador do metabolismo de nucleotídeos; inibidor de ácido graxo sintase e inibidor de síntese de DNA.

Os resultados das análises foram expressos pela diferença (Pa-Pi) e foram classificados como: Pa-Pi < 0: insatisfatório potencial; Pa-Pi < 0,2: baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: alto potencial (SEIBERT et al., 2019).

4.4 Determinação da concentração citotóxica para 50% das células hospedeiras de

***Trypanosoma cruzi* – Fibroblastos de murinos L929**

A citotoxicidade *in vitro* dos diferentes extratos foi testada em fibroblastos L929 não infectados usando o corante alamarBlue®. As células foram expostas aos extratos em concentrações crescentes (40,0, 1.250,0, 2.500,0, 5.000,0, 10.000,0 e 20.000,0 µg/mL). Após o período de incubação com os extratos, foi adicionado o alamarBlue® e a absorbância foi medida entre 570 e 600 nm após entre 4 e 6 h. Os valores de CC₅₀ foram calculados por interpolação linear.

4.5 Atividade tripanocida em epimastigotas

As formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas em fase de crescimento exponencial. O número de parasitos foi determinado pela contagem em uma câmara de Neubauer. Em seguida, os parasitos foram suspensos em meio LIT, suplementado com soro bovino fetal a 10,0% inativado a 56 ° C e a concentração de epimastigotas foi ajustada para 5×10^6 epimastigotas/mL. Os extratos foram incubados em placas de 48 poços contendo 800 µL de suspensão de parasitos e 200 µL de extratos testados em diferentes concentrações (50,0, 25,0, 12,5, 6,3, 3,2, 1,6, 0,8 e 0,4 µg/mL) diluídos em DMSO estéril para 72 h em triplicata. Os parasitos incubados na ausência dos extratos, ou seja, em meio LIT na ausência e presença de DMSO a 1,0% foram utilizados como controle negativo e na presença de benznidazol (50,0, 25,0, 12,5, 6,3, 3,2, 1,6, 0,8 e 0,4 µg/mL) como controle positivo. A atividade foi determinada pela contagem em uma câmara de Neubauer e os valores de IC₅₀ foram calculados por interpolação linear com o auxílio do software CompuSyn. Os testes foram realizados 2 vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

4.6 Atividade tripanocida em amastigotas

A atividade tripanocida foi avaliada em células L929 (fibroblastos de camundongo) infectadas com a cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*. Para o bioensaio, 4.000 células L929 foram adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Após incubação durante a noite, 40.000 tripomastigotas foram adicionados às células e incubados por 2 h. Em seguida, o meio contendo os parasitos extracelulares foi substituído por 200 µL de meio fresco e a placa foi incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. Para a determinação de IC₅₀, as células infectadas foram expostas aos extratos em diferentes concentrações (40,0, 1.250,0, 2.500,0, 5.000,0, 10.000,0 e 20.000,0 µg/mL) e a placa foi incubada. Após o período de

incubação, 50 μ L de 500 μ M de Vermelho de Clorofenil- β -D-Galactopiranosídeo (CPRG) em Nonidet P40 a 0,5% foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por 16 a 20 h, após o qual foi medida a absorvância a 570 nm. Foram utilizados controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas, células infectadas tratadas com benznidazol a 3,8 μ M (controle positivo) ou DMSO 1%.

Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento de *Trypanosoma cruzi* em células testadas com os extratos em comparação com as células infectadas e as células não tratadas. Os valores de IC₅₀ foram calculados por interpolação linear.

4.7 Índice de Seletividade (IS)

O IS foi determinado com base no valor de CC₅₀ na célula hospedeira dividido pelo valor de IC₅₀ do parasito.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e rendimento do extrato hexânico, extrato diclorometânico e do extrato etanólico

Após a extração, os extratos obtidos tiveram o seu rendimento calculado. Foram obtidos 11,0 g do extrato hexânico, 9,1 g do extrato diclorometânico e 7,5 g do extrato etanólico o que equivale ao rendimento apresentado pela **Tabela 2**.

Tabela 2: Rendimento do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico das sementes de *Moringa oleifera* Lam.

AMOSTRAS	RENDIMENTO (%)
Extrato Hexânico	40,7
Extrato Dicolorometânico	37,0
Extrato Etanólico	27,3

Comparando-se os três extratos, observa-se maior rendimento para o extrato hexânico (40,7%), seguido pelo diclorometânico (37,0%). O extrato oleoso com o menor rendimento foi o etanólico (27,3%). Os maiores valores de rendimento para os extratos hexânico e diclorometânico, evidenciam a maior eficiência dos solventes de menor polaridade em extrair substâncias de natureza apolar, como as que compõem os óleos vegetais de maneira geral, em outras palavras, observa-se que quanto menor a polaridade do solvente extrator, maior é o rendimento de extração dos óleos de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. O óleo vegetal obtido via extração com hexano apresenta diversos ácidos graxos, inclusive, 66,26% de ácido oleico, reforçando a maior eficiência do solvente mencionado em extrair os componentes de baixa polaridade das sementes de moringa (ANDRADE et al., 2011). Além disso, os resultados de rendimento encontram-se de acordo com o que já está relatado na literatura (ANUNCIACÃO et al., 2020; ANWAR; BHANGER, 2003).

5.2 Identificação dos compostos voláteis presentes no extrato hexânico, no extrato diclorometânico e no extrato etanólico - Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Após constatar o rendimento satisfatório das extrações, foi realizada a caracterização

dos extratos. A **Tabela 3** mostra os compostos voláteis identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) no extrato hexânico e no extrato diclorometânico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. Não foram identificados compostos voláteis no extrato etanólico, provavelmente pelo etanol ter extraído compostos de maior polaridade, o que impede a identificação por CG/EM, visto que tal técnica possui como limitação a identificação de somente moléculas apolares ou de média polaridade, termoestáveis e volatilizáveis (ALMEIDA, 2004; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

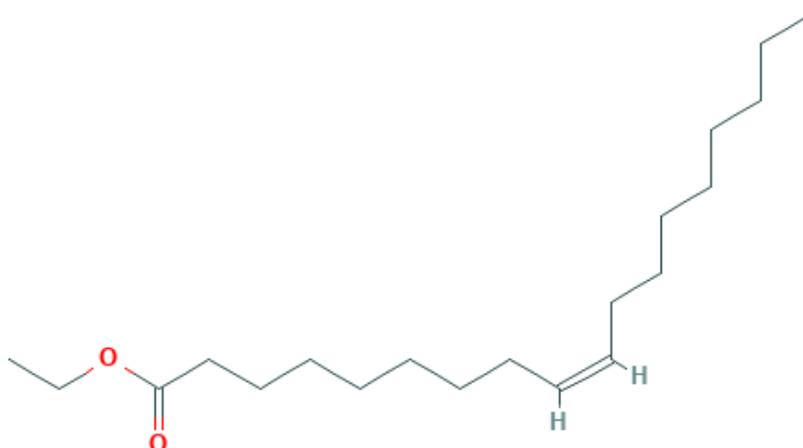
Tabela 3: Compostos voláteis identificados no extrato hexânico e diclorometânico de sementes de *Moringa oleifera* Lam. por CG/EM.

SUBSTÂNCIAS	Extrato hexânico (%)	Extrato diclorometânico (%)
Ácido octanoico	2.88	-
Ácido decanoico	1.05	-
Ácido hexadecanoico	6.34	4.34
Ácido hexadecanoico, éster etílico	0.31	-
Ácido 8-octadecenoico, éster metílico	0.72	2.80
Ácido 6-octadecenoico	57.49	36.72
Etil oleato	5.92	3.53
Ácido oleico	0.95	1.01
9-octadecenal (Z)	9.69	18.63
Esqualeno	0.72	0.82
Alfa-tocoferol	0.86	1.26
Campesterol	1.11	2.34
Estigmasterol	1.77	2.92
gamma-Sitosterol	2.55	4.75
Estigmast-4-en-3-ona	0.80	-

Ácido 9-octadecenoico (Z) -, éster 2-hidroxi-1- (hidroximetil) etil	-	0.81
Ácido docosanoico, éster metílico	-	0.71

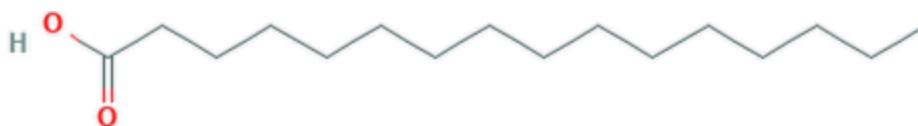
Foram identificados quinze compostos do extrato hexânico e treze compostos do extrato diclorometânico, sendo que onze das substâncias identificadas estão presentes em ambos. Os compostos voláteis em maior quantidade nos dois extratos são: etil oleato (**Figura 7**), ácido hexadecanoico (**Figura 8**), 9-octadecenal (Z) (**Figura 9**) e ácido 6-octadecenoico (**Figura 10**), sendo a última a mais abundante.

Figura 7: Estrutura química do etil oleato.



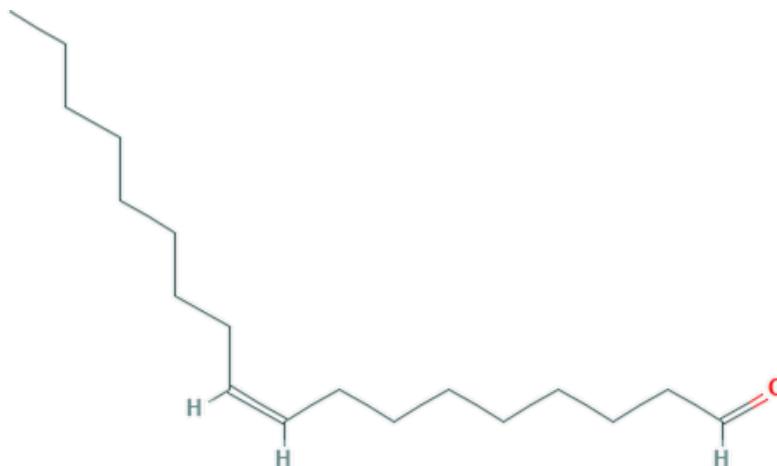
Fonte: PUBCHEM, 2020.

Figura 8: Estrutura química do ácido hexadecanoico.



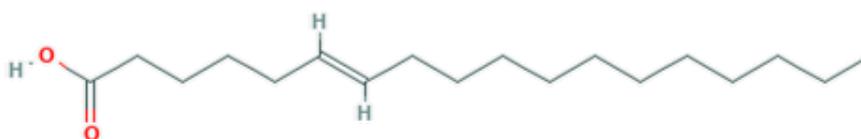
Fonte: PUBCHEM, 2020.

Figura 9: Estrutura química do 9-octadecenal (Z).



Fonte: PUBCHEM, 2020.

Figura 10: Estrutura química do ácido 6-octadecenoico.



Fonte: PUBCHEM, 2020.

Vale ressaltar que os compostos identificados não representam a composição total dos extratos devido às limitações do CG/EM já mencionadas. Outras análises seriam necessárias para a identificação dos compostos supostamente polares, não identificados, como em Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC/MS), tendo em vista que o acoplamento de um cromatógrafo a líquido com o espectrômetro de massas combina alta seletividade e eficiência de separação (vantagens da cromatografia) com informação estrutural, massa molar e aumento de seletividade e detectabilidade (vantagens da espectrometria de massas) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; OSHITA; JARDIM, 2015; PRESTES et al., 2009).

5.3 Avaliação dos potenciais efeitos biológicos *in silico* sobre o *Trypanosoma cruzi*

Tendo identificado os compostos voláteis de dois dos três extratos, avaliou-se potenciais efeitos biológicos que têm sido relatados como alvos contra o *Trypanosma cruzi*, com a

finalidade de classificar os compostos ativos e direcionar os experimentos que foram feitos posteriormente, facilitando e reduzindo custos no processo de desenvolvimento de novos fármacos (CARADONNA et al., 2013; GUTTERIDGE, 1976; T.J. SCHMIDT et al., 2012; URBINA; DOCAMPO, 2003). A análise dos possíveis efeitos biológicos foi realizada para prever se as substâncias identificadas poderiam possuir algum efeito sobre o *Trypanosoma cruzi*.

A **Tabela 4** mostra os resultados dos potenciais efeitos biológicos *in silico* dos compostos identificados no extrato hexânico e diclorometânico de sementes de *Moringa oleifera* Lam. por CG/EM sobre o *Trypanosoma cruzi* utilizando o PASS (SEIBERT et al., 2019). De acordo com os resultados, todos os compostos identificados apresentaram pelo menos moderado potencial para no mínimo um dos efeitos biológicos sobre o *Trypanosoma cruzi*. A maioria das substâncias identificadas por CG/EM apresentaram moderado potencial antiparasitário. Os compostos etil oleato (substância em grande quantidade em ambos os extratos) e esqualeno, se destacaram, visto que apresentaram alto potencial para o mesmo efeito. O alfa-tocoferol apresentou baixo potencial antiparasitário e os compostos campesterol, estigmasterol, gamma-Sitosterol e estigmast-4-en-3-ona potencial não indicado ou insatisfatório.

Como o *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado, também foi avaliado o potencial antiprotozoário. A maioria das substâncias apresentaram de insatisfatório a baixo potencial para tal atividade, com exceção do esqualeno, que apresentou moderado potencial antiprotozoário. Também foi avaliado o potencial antiprotozoário específico para o gênero *Trypanosoma*. Curiosamente, foi possível observar que os resultados para essa atividade corroboraram com os do potencial antiparasitário, sendo o esqualeno, o composto com alto potencial para tal atividade.

A associação de fármacos é uma das estratégias utilizadas na tentativa de melhoria da quimioterapia atual da doença de Chagas (CUNHA et al., 2019). Sendo assim, foi analisada a possibilidade de haver efeito potencializador de atividade antiparasitária para o caso da utilização dos diferentes compostos identificados juntamente com os fármacos eficazes para o tratamento da doença de Chagas (benznidazol ou nifurtimox). De acordo com os resultados, foi observado que o potencial das substâncias variou entre insatisfatório e baixo, descartando um efeito sinérgico entre tais substâncias e os fármacos com eficácia já comprovada. Assim como

o efeito potencializador de atividade antiparasitária, o efeito como inibidor de ácido graxo sintase também foi descartado, visto que os resultados apontaram para insatisfatório ou baixo potencial para tal.

Com relação à avaliação do provável efeito potencializador de permeabilidade da membrana, observa-se os maiores valores de Pa-Pi para todas as substâncias identificadas. As substâncias apresentaram de moderado a alto potencial para esse efeito, sugerindo que essas agiriam sobre o *Trypanosoma cruzi* predominantemente por esse efeito biológico. Vale destacar, que duas das quatro substâncias majoritárias dos dois extratos, o ácido hexadecanoico e o ácido 6-octadecenoico apresentaram alto potencial para permeabilidade de membrana, o que indica maior probabilidade de atividade tripanocida para os extratos. Tal efeito pode estar relacionado com a natureza pouco polar das substâncias identificadas, visto que uma menor polaridade facilita a interação com os constituintes da membrana, levando a alteração de estrutura, perda de função e conseqüentemente à morte do parasito (AZEREDO et al., 2014). Outros autores apontam que o efeito de permeabilidade de membrana de substâncias vem sendo eficaz contra o *Trypanosoma cruzi*, o que reforça o potencial tripanocida das substâncias identificadas neste estudo (CONSERVA et al., 2019; GRECCO et al., 2017).

Os demais potenciais efeitos biológicos estudados, bem como: inibidor de biossíntese de parede celular, inibidor da síntese de colesterol, regulador do metabolismo de nucleotídeos e inibidor de síntese de DNA, indicaram majoritariamente um moderado potencial para tais efeitos para a maioria das substâncias identificadas, inclusive para as que estão em maior quantidade no extrato. O alfa-tocoferol foi uma exceção, visto que apresentou alto potencial como regulador do metabolismo de nucleotídeos, entretanto, deve-se considerar que tal substância está em baixa quantidade tanto no extrato hexânico, quanto no extrato diclorometânico das sementes de *Moringa oleifera* Lam..

Tabela 4: Previsões *in silico* dos compostos identificados do extrato hexânico e do extrato diclorometânico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. sobre o *Trypanosoma cruzi* utilizando o PASS.

SUBSTÂNCIAS	POTENCIAL EFEITO BIOLÓGICO*									
	Antiparasitário	Antiprotozoário	Antiprotozoário (<i>Trypanosoma</i>)	Potencializador de atividade antiparasitária	Potencializador de permeabilidade de membrana	Inibidor de biossíntese de parede celular	Inibidor da síntese de colesterol	Regulador do metabolismo de nucleotídeos	Inibidor de ácido graxo sintase	Inibidor de síntese de DNA
Ácido octanoico	0,34	-	0,359	0,012	0,556	0,333	0,376	0,493	0,069	0,357
Ácido decanoico	0,34	-	0,359	0,012	0,556	0,333	0,376	0,493	0,069	0,357
Ácido hexadecanoico	0,34	-	0,359	0,012	0,556	0,333	0,376	0,493	0,069	0,357
Ácido hexadecanoico, éster etílico	0,462	0,079	0,332	0,002	0,465	0,242	0,303	0,446	0,088	0,322
Ácido 8-octadecenoico, éster metílico	0,451	0,11	0,373	0,007	0,508	0,177	0,334	0,057	0,095	0,278
Ácido 6-octadecenoico	0,416	-	0,451	-	0,575	0,254	0,389	0,376	0,098	0,335
Etil oleato	0,508	0,087	0,42	-	0,495	0,132	0,319	0,33	0,109	0,297
Ácido oleico	0,416	-	0,451	-	0,575	0,254	0,389	0,376	0,098	0,335
9-octadecenal (Z)	0,34	0,039	0,428	-	0,468	0,209	0,26	-	0,098	0,264
Esqualeno	0,544	0,376	0,584	-	0,577	0,177	-	0,255	0,1	0,207
Alfa-tocoferol	0,029	-	-	-	0,487	-	-	0,824	-	-
Campesterol	-	0,02	-	-	0,498	-	-	-	-	-
Estigmasterol	-	-	-	-	0,398	-	-	-	-	-
gamma-Sitosterol	-	0,022	-	-	0,482	-	-	-	-	-
Estigmast-4-en-3-ona	-	-	-	-	0,325	-	-	-	-	-
Ácido 9-octadecenoico (Z) -, éster 2-hidroxi-1- (hidroximetil) etil	0,393	0,162	0,403	-	0,588	0,069	-	0,243	0,087	0,425
Ácido docosanoico, éster metílico	0,404	0,107	0,293	0,021	0,48	0,274	-	0,225	0,067	0,305

*: Valores da diferença Pa-Pi; -: Não indicado ou insatisfatório; Pa-Pi < 0,2: baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: alto potencial.

5.4 Citotoxicidade, atividade tripanocida e índice de seletividade

No Brasil, o benznidazol é o único medicamento utilizado no tratamento da doença de Chagas. Justamente por isso, foi a única substância usada como um controle em todos os ensaios biológicos do estudo. Devido aos importantes efeitos adversos causados por esse fármaco e ao acúmulo de resistência por diferentes cepas do parasito, tem sido investigada a atividade tripanocida de diferentes compostos na busca por novos tratamentos da doença (MOREIRA et al., 2014; SANDES et al., 2010).

Já é bem conhecido que as substâncias com potencial para uso na terapia de doenças infecciosas, como a doença de Chagas, precisam ser tóxicas para os parasitos sem afetar a viabilidade das células hospedeiras, ou pelo menos causar mais danos aos parasitos do que aos hospedeiros. Por isso, foi investigada a citotoxicidade dos extratos em relação as células infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (fibroblastos de murinos da linhagem L929), para que fosse possível determinar a CC_{50} dos extratos para essas células e também calcular o seu índice de seletividade. Constatou-se que todos os extratos possuem citotoxicidade inferior ao do benznidazol, sendo o extrato hexânico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. o menos citotóxico ($CC_{50} = > 20.000,0 \mu\text{g/mL}$), indicando uma maior segurança no uso desses extratos. (BERMUDEZ et al., 2016).

Comprovada a baixa citotoxicidade, para uma triagem inicial, os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. foram avaliados quanto a atividade tripanocida em formas epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, normalmente presentes no intestino do hospedeiro invertebrado da doença de Chagas (**Tabela 5**) (MENEZES et al., 2015; MOREIRA et al., 2014). Observa-se que entre os extratos do estudo, os mais ativos, foram o hexânico ($IC_{50} = 14,7 \mu\text{g/mL}$) e o diclorometânico ($IC_{50} = 14,9 \mu\text{g/mL}$). O extrato etanólico foi o menos ativo ($IC_{50} = 33,4 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, o benznidazol ainda foi mais ativo que todos os extratos, apresentando um IC_{50} de $1,0 \mu\text{g/mL}$. A concentração inibitória para 50% dos parasitos relativamente próxima e baixa do extrato hexânico e diclorometânico pode estar relacionada com a composição muito parecida constatada pela CG/EM, bem como com os diversos possíveis efeitos biológicos constatados na avaliação *in silico*. Ainda comparando esses dois extratos, o resultado um pouco melhor do extrato hexânico pode ser devido ao fato de que três das quatro substâncias majoritárias identificadas dos dois extratos,

etil oleato (alto potencial antiparasitário), ácido 6-octadecenoico (alto potencial para potencializador de permeabilidade e membrana) e ácido hexadecanoico (alto potencial para potencializador de permeabilidade e membrana), estão em maior quantidade no extrato hexânico. Vale ressaltar, que a composição de extratos em geral é muito complexa, podendo ter substâncias ativas e inativas que não foram identificadas em contato com o parasito ao realizar o ensaio.

Tabela 5: Atividade tripanocida do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico em formas epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade em fibroblastos de murinos da linhagem L929 e índice de seletividade.

AMOSTRAS	IC ₅₀ (µg/mL) – Formas	CC ₅₀ (µg/mL) – Células	IS – Formas
	Epimastigotas	L929	Epimastigotas
Extrato Hexânico	14,7	> 20.000,0	> 1.360,5
Extrato Dicolorometânico	14,9	4.193,9	281,5
Extrato Etanólico	33,4	> 10.000,0	> 299,4
Benznidazol	1,0	> 500,0	> 500,0

IC₅₀: concentração que inibe 50% dos parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células; IS: índice de seletividade.

Após avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* nas formas extracelulares do parasito, foi avaliada a atividade tripanocida nas formas amastigotas intracelulares da cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*, presentes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (**Tabela 6**). Diferentemente dos resultados em formas epimastigotas da cepa Y do *Trypanosmoa cruzi*, os extratos apresentaram baixa (extrato hexânico e etanólico) ou nenhuma atividade (extrato diclorometânico) contra o parasito, sugerindo uma maior resistência dessas formas contra as substâncias com potencial presentes nesses extratos ou uma possível proteção da célula hospedeira, visto que as formas amastigotas do parasito são intracelulares. Destaca-se, ainda, que essa grande diferença entre o perfil de atividade tripanocida pode ser devido às diferentes cepas utilizadas no estudo, levando em consideração que diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, possuem diferentes perfis de resistência e de comportamento (DE VALAMIEL OLIVEIRA-SILVA et al., 2015; VELOSO et al., 2001). Um estudo recente com uma substância de origem natural, a licnopholida, demonstrou que tal substância obteve melhor performance

contra o *Trypanosoma cruzi* quando formulada em nanocápsulas poliméricas. A forma livre da licnopholida foi menos eficiente, indicando que estudos nesse sentido, poderiam melhorar a ação tripanocida dos compostos dos extratos de sementes de *Moringa oleifera* Lam. (BRANQUINHO et al., 2020).

Tabela 6: Atividade tripanocida do extrato hexânico, diclorometânico e etanólico em formas amastigotas da cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade em fibroblastos de murinos da linhagem L929 e índice de seletividade.

AMOSTRAS	IC ₅₀ (µg/mL) – Formas Amastigotas	CC ₅₀ (µg/mL) – Células L929	IS – Formas Amastigotas
Extrato Hexânico	> 10.000,0	> 20.000,0	> 2,0
Extrato Dicolorometânico	Inativo	4.193,9	-
Extrato Etanólico	> 5.000,0	> 10.000,0	> 2,0
Benznidazol	0,4	> 500,0	> 1.250,0

IC₅₀: concentração que inibe 50% dos parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células; IS: índice de seletividade.

A capacidade dos extratos em lisar o parasito é maior que a capacidade em afetar a viabilidade da célula hospedeira, apenas variando a intensidade de atividade tripanocida de acordo com a forma evolutiva do parasito. Esse resultado pode ser claramente observado ao observar o índice de seletividade (IS) dos extratos nas formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Nesse sentido, novamente o extrato hexânico (IS = >1.360,5) se destacou, pois, apresentou um IS superior ao do fármaco de referência (IS = >500,0), indicando potencial desse extrato ou de algumas substâncias presentes nesse extrato para novos tratamentos da doença de Chagas.

6. CONCLUSÃO

Os compostos identificados nos extratos hexânico e diclorometânico das sementes de *Moringa oleifera* Lam. indicaram *in silico*, alta probabilidade para o efeito potencializador de permeabilidade da membrana. Todos os extratos apresentaram segurança *in vitro* e se mostraram mais potentes *in vitro* contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* quando comparados com as formas amastigotas do parasito, mostrando que estudos mais específicos seriam necessários para avaliar a possibilidade do uso desses extratos em futuros tratamentos.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULKARIM, S. M. et al. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 253–263, 2005.
- ALMEIDA, D. Aula - Espectrometria de Massas. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2004, p. 1–5, 2004.
- ANDRADE, G. DE F. et al. Biological evaluation of crude and degummed oil from *Moringa oleifera* seeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1003–1006, 2011.
- ANUNCIACÃO, K. D. F. et al. Antioxidant activity evaluation and total phenolics in oils of seed extracted of the *Moringa oleifera* Lam. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, p. 148–154, 2020.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Grown in Temperate Regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558–6563, 2003.
- AZEREDO, C. M. O. et al. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BRANQUINHO, R. T. et al. Lychnopholide in poly(D,L-lactide)-block-polyethylene glycol nanocapsules cures infection with a drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strain at acute and chronic phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 1–13, 2020.
- CALIXTO, J. B. BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37–39, 2003.
- CARADONNA, K. L. et al. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 1, p. 108–117, 2013.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 1 n. 2, 1909.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CONSERVA, G. A. A. et al. Butenolides from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via deregulation of mitochondria. **Phytomedicine**, v. 54, p. 302–307, 2019.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 31–40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Surveillance, health promotion and control of chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: A proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 825–830, 2015.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.

CUNHA, E. L. A. et al. Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 204, n. April, p. 107711, 2019.

DA SILVA, C. F. et al. Activities of psilostachyin A and cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5307–5314, 2013.

DE MELLO, C. G. C. et al. Efficacy of lychnopholide polymeric nanocapsules after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 60, n. 9, p. 5215–5222, 2016.

DE VALAMIEL OLIVEIRA-SILVA, J. C. et al. Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* ii strains isolated from children of the jequitinhonha valley, Minas Gerais, Brazil, with chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 86–94, 2015.

ESPUELAS, S. et al. Innovative Lead Compounds and Formulation Strategies As Newer Kinetoplastid Therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 25, p. 4259–4288, 2012.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

GOYAL, B. R. et al. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. - An overview. **Natural Product Radiance**, v. 6, n. 4, p. 347–353, 2007.

GRECCO, S. S. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 24, p. 62–67, 2017.

GUTTERIDGE, W. E. Chemotherapy of Chagas' disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 2, p. 123–124, 1976.

JANG, M. H. et al. Inhibition of cholinesterase and amyloid- β aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 544–549, 2008.

MENEZES, J. C. L. et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 43–51, 2015.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A. et al. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. **Acta Tropica**, v. 101, n. 1, p. 54–60, 2007.

MOREIRA, D. R. M. et al. Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **ChemMedChem**, v. 9, n. 1, p. 177–188, 2014.

NEVES, DAVID PEREIRA; DE MELO, ALAN LANE; LINARDI, PEDRO MARCOS; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. [s.l: s.n.].

NOVA, I. C. V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers modulates the immune response *in vitro* of *Trypanosoma cruzi*-infected human cells. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2020.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of Methods By Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Multiresidues in Strawberries. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273–1281, 2015.

PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, H. An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. **South African Journal of Botany**, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Seminar Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

PONTUAL, E. V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural Product Research**, v. 32, n. 24, p. 2940–2944, 2018.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **THE LANCET Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PROJETO VERDE. **MORINGA – MORINGA OLEIFERA**. Disponível em: <<https://appverde.wordpress.com/2015/09/17/moringa-moringa-oleifera/>>. Acesso em: 22 nov. 2020.

PUBCHEM. **Estrutura química do nifurtimox**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nifurtimox#section=2D-Structure>>. Acesso em: 22 nov. 2020a.

PUBCHEM. **Estrutura química do benznidazol.** Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benznidazole>>. Acesso em: 22 nov. 2020b.

PUBCHEM. **Ethyl oleate.** Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5363269>>. Acesso em: 22 nov. 2020c.

PUBCHEM. **Palmitic acid.** Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/985>>. Acesso em: 22 nov. 2020d.

PUBCHEM. **Olealdehyde.** Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5364492>>. Acesso em: 21 nov. 2020e.

PUBCHEM. **Petroselaidic acid.** Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282754>>. Acesso em: 22 nov. 2020f.

RASSI JR, A.; MARIN-NETO, A. Seminar Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.

ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. March, p. 233–238, 2010.

SALEM, M.; WERBOVETZ, K. Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006.

SANDES, J. M. et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 190–195, 2010.

SEIBERT, J. B. et al. Nanostructured Systems Improve the Antimicrobial Potential of the Essential Oil from *Cymbopogon densiflorus* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 12, p. 3208–3220, 2019.

SEMENTES CAIÇARA. **Moringa oleifera.** Disponível em:
<<https://loja.sementescaicara.com/-moringa-oleifera-3>>. Acesso em: 22 nov. 2020.

T.J. SCHMIDT et al. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part II. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176–2228, 2012.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

VELOSO, V. M. et al. Variation in Susceptibility to Benznidazole in Isolates Derived from *Trypanosoma cruzi* Parental Strains. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 1005–1011, 2001.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 61, n. 05, p. 129–165, 2006.