

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Anna Maria Romano Silva

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE
DE EXTRATOS DE FRUTOS E FOLHAS DA ESPÉCIE *Sechium edule* (Jacq.) Swartz
(CHUCHU) CONTRA O *Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte (MG)

2024

Anna Maria Romano Silva

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE
DE EXTRATOS DE FRUTOS E FOLHAS DA ESPÉCIE *Sechium edule* (Jacq.) Swartz
(CHUCHU) CONTRA O *Trypanosoma cruzi***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química Tecnológica.**

**Orientador: Prof. Dr. Esther Maria Ferreira
Lucas.**

**Co-orientador: Dr. Tânia Maria de Almeida
Alves.**

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2024

Anna Maria Romano Silva

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE
DE EXTRATOS DE FRUTOS E FOLHAS DA ESPÉCIE *Sechium edule* (Jacq.) Swartz
(CHUCHU) CONTRA O *Trypanosoma cruzi***

**Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em
Química Tecnológica
CEFET-MG**

Belo Horizonte, 15 de agosto de 2024

**Prof. Dr. Esther Maria Ferreira Lucas
(orientadora – CEFET-MG)**

**Dr. Tânia Maria de Almeida Alves
(co-orientadora – FIOCRUZ MINAS)**

**Prof^a. Dra. Fátima de Cassia Oliveira Gomes
(avaliadora – CEFET-MG)**

**Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia
(avaliador – CEFET-MG)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pela oportunidade da realização da minha graduação no CEFET-MG, onde pude ter cinco longos anos de aprendizado. Agradeço pela estrutura, pelo corpo docente e por todas as experiências acadêmicas proporcionadas pela instituição, as quais me proporcionaram um enorme amadurecimento pessoal, acadêmico e profissional. Também agradeço ao Instituto René Rachou - FIOCRUZ MINAS e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos pela oportunidade da realização da minha primeira iniciação científica e elaboração do meu trabalho de conclusão de curso. Sou grata a estrutura e ao corpo de pesquisadores que sempre se puseram à disposição, me auxiliaram e incentivaram durante toda minha trajetória na pesquisa acadêmica.

Agradeço a todos os professores e servidores por me proporcionarem conhecimento, não apenas intelectual, mas também em termos de caráter e afeto na educação durante minha formação profissional. Posso dizer com certeza que a dedicação deles foi crucial, não apenas por terem me ensinado, mas por terem me mostrado as ferramentas necessárias para se colocar em prática tudo aquilo visto em sala de aula.

Sou especialmente grata às minhas orientadoras Esther Maria Ferreira Lucas e Tânia Maria de Almeida Alves, que me apoiaram, incentivaram e se esforçaram para que eu pudesse realizar todos os trabalhos durante a elaboração e revisão desta monografia. A elas, meus eternos agradecimentos. Sou grata também à Adriana Fernandes de Souza, moradora e raizeira da comunidade Cabana do Pai Tomás, por ter compartilhado comigo um pouco do seu conhecimento da medicina tradicional e indicado a espécie *Sechium edule* para objeto de estudo deste trabalho.

Aos meus pais, Anita e Edmar, que, apesar de todas as dificuldades, me fortaleceram e apoiaram em todos os momentos. Eles foram essenciais para que eu alcançasse esse sonho, pois sem o sacrifício deles para que eu pudesse dispor da melhor qualidade de vida possível, eu com certeza não conseguiria alcançar o título de bacharel em química tecnológica. Aos meus tios e tias, primos e amigos que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte da minha formação, me apoiando e incentivando para que em momentos de dificuldade eu não desistisse, meu muito obrigado!

RESUMO

Preparo, caracterização química e avaliação da bioatividade de extratos de frutos e folhas da espécie *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (chuchu) contra o *Trypanosoma cruzi*

ROMANO, A. M.; LUCAS, E. M. F.; ALVES, T. M. A.

Descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas classifica-se como uma infecção sistêmica de evolução crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Considerada como uma patologia tropical negligenciada, a ocorrência desta infecção acomete o continente da América latina, sendo os insetos da família dos triatomíneos, popularmente conhecidos como “insetos barbeiros”, os principais vetores responsáveis por sua transmissão nos hospedeiros vertebrados. A maior incidência de casos epidemiológicos ocorre em regiões rurais principalmente devido a deficiências na qualidade de vida das populações interioranas, uma vez que as condições de moradia de comunidades carentes do interior usualmente podem servir de habitat para insetos triatomíneos que hospedam o protozoário. Apesar de haver um grande avanço ao longo dos anos quanto à potenciais drogas terapêuticas anti-*Trypanosoma cruzi*, atualmente nenhuma apresenta resultado capaz de promover a cura definitiva da fase crônica da tripanossomíase, apenas promovem efeitos supressivos. Nesta perspectiva, os fitofármacos presentes em plantas medicinais referem-se a um possível recurso complementar para o tratamento de tal enfermidade, uma vez que estudos laboratoriais de determinados produtos naturais de espécies vegetais confirmam sua atividade contra células do protozoário *T. cruzi*. A espécie *Sechium edule* (Jacq.) Sw., conhecida popularmente como chuchu, é utilizada na medicina tradicional por apresentar uma vasta composição nutricional e propriedades farmacológicas, relacionadas especialmente a problemas de hipertensão, renais, intestinais e entre outros. Apesar da carência de estudos bibliográficos a respeito da possível atividade do chuchu contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, pesquisas relatam uma ação positiva contra o patógeno para algumas flavonas presentes na composição desta espécie: a apigenina, luteolina e vicenina-2. Assim, o trabalho em questão propôs o preparo em diferentes condições de extratos de chuchu, a sua caracterização química e avaliação da possível bioatividade destes diferentes extratos sobre o *Trypanosoma cruzi*. Como metodologias empregadas no estudo, realizou-se o preparo de extratos vegetais das folhas secas e frescas, bem como do fruto, empregando-se as técnicas de extração por maceração e Soxhlet e com o emprego dos solventes etanol e diclorometano. Em seguida, determinou-se o perfil químico e cromatográfico dos extratos preparados, por intermédio da aplicação das técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (UHPLC-ESI-MS/MS). Por fim, avaliou-se preliminarmente a atividade dos extratos, por uma triagem *in vitro* de drogas anti - *T. cruzi*. Os resultados do estudo por UHPLC-ESI-MS/MS identificaram a presença dos flavonóides e flavonas isoschaftosídeo, roifolina, diosmina, luteolina, kaempferol e crisoeriol, além de aminoácidos no estudo sobre as frações dos extratos etanólicos das folhas da espécie, bem como açúcares, aminoácidos e ácidos graxos glicosilados nas frações dos extratos etanólicos dos frutos. Além disso, o método extrativo que conduziu a presença de maior variedade de flavonóides foi o emprego de folhas secas por maceração a frio em etanol. Os ensaios de triagem *in vitro* de drogas anti - *Trypanosoma cruzi* apontaram resultados insatisfatórios para a inibição do crescimento do patógeno, apesar de terem sido detectadas, nos extratos etanólicos das folhas da espécie, as flavonas que apresentam ação sobre o *T. cruzi*, a apigenina e luteolina.

Palavras-chave: *Sechium edule*. Fitofármacos. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 - Tratamento das folhas de <i>Sechium edule</i>	45
Esquema 2 - Tratamento dos frutos de <i>Sechium edule</i>	45
Figura 1 - Ciclo biológico de vida do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 2 - Principais classes de metabólitos secundários e suas vias de biossíntese.....	22
Figura 3 - Instrumentação da destilação por Soxhlet	28
Figura 4 - Instrumentação do rotavapor	29
Figura 5 - Processo sequencial adotado pela OMS para triagem de drogas anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 6 - <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw	38
Figura 7 – Estrutura dos principais metabólitos secundários presentes na composição fitoquímica da espécie <i>Sechium edule</i>	40
Figura 8 - (A) Cromatograma obtido para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de <i>Sechium edule</i> , (B) espectro de massas do íon do pico cromatográfico em tr igual a 2,1 min, seu espectro de fragmentação e espectro de fragmentação de referência da biblioteca <i>MassBank</i>	71
Figura 9 – Estruturas químicas das substâncias anotadas por UHPLC ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de <i>Sechium edule</i>	77
Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias anotadas por UHPLC ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de <i>Sechium edule</i>	78
Fotografia 1 - Aspecto visual do extrato etanólico de folhas frescas de <i>S. edule</i> X Aspecto visual do extrato em diclorometano de folhas frescas de <i>S. edule</i>	56
Fotografia 2 - CCD dos extratos em etanol e diclorometano dos frutos <i>S. edule</i> eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de vanilina sulfúrica	61

Fotografia 3 - CCD dos extratos em etanol e diclorometano dos frutos <i>S. edule</i> eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de Produtos Naturais – Polietileno glicol	63
Fotografia 4 - CCD dos extratos em diclorometano dos frutos <i>S. edule</i> eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e revelados com solução de vanilina sulfúrica.....	64
Fotografia 5 - CCD dos extratos em diclorometano das folhas <i>S. edule</i> eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e revelados com solução de vanilina sulfúrica.....	65
Fotografia 6 - CCD dos extratos em diclorometano das folhas <i>S. edule</i> eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e visualização em luz UV 365 nm	66
Fotografia 7 - CCD dos extratos em etanol das folhas <i>S. edule</i> eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de vanilina sulfúrica	67
Fotografia 8 - CCD dos extratos em etanol das folhas <i>S. edule</i> eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e visualização em luz UV 254 nm	68
Fotografia 9 - CCD dos extratos em etanol das folhas <i>S. edule</i> eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de Produtos Naturais – Polietileno glicol	69
Quadro 1 – Substâncias anotadas nos diferentes métodos de extração aplicados para as amostras de <i>Sechium edule</i> e suas respectivas classes e massas de íons percussores	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre alguns métodos extrativos com sua capacidade de esgotamento da matéria-prima vegetal.....	26
Tabela 2 - Composição química nutricional da espécie <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw (para 100 gramas de matéria seca).....	38
Tabela 3 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos dos frutos de <i>S. edule</i> na placa cromatográfica.....	48
Tabela 4 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos em diclorometano das folhas de <i>S. edule</i> na placa cromatográfica.....	50
Tabela 5 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos em diclorometano das folhas de <i>S. edule</i> na placa cromatográfica.....	50
Tabela 6 - Relação das massas das frações vegetais antes e após a secagem e relação com seu teor de água perdido.....	55
Tabela 7 - Tabela comparativa de rendimentos dos extratos de <i>Sechium edule</i> preparados por diferentes técnicas.....	58
Tabela 8 - Substâncias anotadas por UHPLC-ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de <i>Sechium edule</i>	73
Tabela 9 - Resultados encontrados para a triagem <i>in vitro</i> de drogas anti – <i>Trypanosoma cruzi</i> dos extratos brutos de <i>Sechium edule</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Cal	Calorias
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ED ₅₀	Dose efetiva média (do inglês, <i>Effective dose</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Espectrometria de Massas
eV	EletronVolts
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
G	Gramas
g/mL	Gramas por mililitro
Hz	Hertz
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média (do inglês, <i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>)
LD ₅₀	Dose letal mínima (do inglês, <i>Lethal dose</i>)
L/min	Litro por minuto
M	Metro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Min	Minuto

mg/mL	Miligrama por mililitro
Nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UHPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry</i>)
UV-Vis	Ultravioleta Visível
V	Volts
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.2. PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS	20
3.2.1 Plantas medicinais e fitofármacos	20
3.2.2 Plantas medicinais utilizadas na história para tratar infecções por patógenos	23
3.2.3 Fatores que afetam a composição dos extratos vegetais	25
3.2.4 Estudos fitoquímicos biomonitorados	29
3.2.4.1 Fases do estudo.....	29
3.2.4.2. Ensaio biológico da atividade anti- <i>Trypanosoma</i>	35
3.3 <i>Sechium edule</i> E SUAS PROPRIEDADES.....	37
3.3.1 Produtos naturais da espécie <i>Sechium edule</i>	39
3.3.2 Interesse em testar a atividade <i>anti-Trypanosoma</i> da espécie.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	42
4.2 COLETA E TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL DA ESPÉCIE <i>Sechium edule</i>	43
4.3.1 Destilação dos solventes extratores	46
4.3.2 Extração por maceração.....	46
4.3.3 Extração por Soxhlet	46
4.3.4 Remoção dos solventes dos extratos	47
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS	48
4.4.1 Caracterização por Cromatografia por Camada Delgada.....	48

4.4.1.1. Caracterização dos extratos dos frutos de <i>Sechium edule</i>	48
4.4.1.2. Caracterização dos extratos das folhas de <i>Sechium edule</i>	49
4.4.2 Caracterização dos extratos em diclorometano por GC – MS.....	50
4.4.2.1 Preparo dos extratos brutos	50
4.4.2.2 Instrumentação e condições de análise.....	51
4.4.3 Caracterização dos extratos em etanol por HPLC-MS.....	51
4.4.3.1 Preparo dos extratos brutos	51
4.4.3.2 Instrumentação e condições de análise.....	51
4.5 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS.....	52
4.5.1 Ensaio biológico para triagem <i>in vitro</i> de drogas anti – <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
4.5.1.1 Manutenção de células para plaqueamento	52
4.5.1.2 Plaqueamento das células, infecção e tratamento.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 PREPARO DOS EXTRATOS	55
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NOS EXTRATOS	60
5.2.1 Caracterização por Cromatografia por Camada Delgada.....	60
5.2.1.1 Caracterização dos extratos dos frutos de <i>Sechium edule</i>	60
5.2.1.2 Caracterização dos extratos das folhas de <i>Sechium edule</i>	64
5.2.2 Caracterização dos extratos em diclorometano das folhas e frutos de <i>Sechium edule</i> por GC – MS.....	69
5.2.3 Caracterização dos extratos em etanol das folhas e frutos de <i>Sechium edule</i> por HPLC- MS	70
5.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Sechium edule</i>	84
5.4.1 Ensaio biológico para triagem <i>in vitro</i> de drogas anti – <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Descrita em 1909 pelo médico cientista brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas caracteriza-se como uma infecção sistêmica de evolução crônica, causada pelo protozoário monoflagelado *Trypanosoma cruzi*. O agente etiológico da doença é representante da Família Trypanosomatidae, sendo categoricamente encontrado tanto em hospedeiros vertebrados, sendo comumente presente no homem, cães, gatos morcegos e outros animais, quanto em seus vetores invertebrados (VINHAES e DIAS, 2000). Apesar de poder ser difundida de maneira transfusional, 80% da transmissão desta doença infecciosa é realizada por meio de um mecanismo vetorial do parasita através de insetos triatomíneos, sendo a espécie *Triatoma infestans*, popularmente conhecida como inseto barbeiro, a principal responsável pela endemia chagásica em países da América do Sul (WHO, 2024).

A ocorrência desta infecção se dá em quase todo continente da América latina, categorizando-se como uma das patologias endêmicas de maior distribuição neste território. A maior incidência de casos epidemiológicos em regiões rurais se deve principalmente a deficiências na qualidade de vida de populações do interior. Isto pois, as condições de moradia de comunidades interioranas usualmente podem servir de habitat para insetos triatomíneos que hospedam o *Trypanosoma cruzi* (VINHAES e DIAS, 2000).

O curso clínico desta doença é caracterizado como bifásico, marcado por uma fase aguda (que pode ser sintomática ou assintomática) e uma fase crônica, cujos sintomas estão diretamente relacionados aos sistemas cardiovascular e digestivo. À vista disso, a doença de Chagas refere-se a um problema preocupante justamente pela variedade de danos que envolvem o paciente chagásico. O ciclo biológico do parasita em seus hospedeiros, por sua vez, é considerado complexo e apresenta as formas evolutivas tripomastigotas, amastigotas, epimastigotas e esferomastigotas. Entretanto, dentre estas formas, somente a tripomastigotas e amastigotas são ocorrentes nos hospedeiros vertebrados e, por isso, são utilizadas como marcadores para a identificação laboratorial da doença (COSTA et al., 2018).

Além de ser classificada como uma enfermidade endêmica, outra grande preocupação quanto à doença de Chagas é o fato de seu tratamento prosseguir parcialmente ineficaz. Isto pois, apesar de haver um grande avanço ao longo dos anos quanto à potenciais drogas terapêuticas para esta doença, nenhuma até então apresenta um resultado capaz de promover a cura definitiva da fase crônica da tripanossomíase, promovendo apenas, efeitos supressivos da fase aguda (WHO, 2024).

Nesta perspectiva, os fitofármacos presentes em plantas medicinais referem-se a um possível recurso complementar de tratamento de tal enfermidade, uma vez que estudos

laboratoriais de determinados produtos naturais oriundos de espécies de plantas apresentam bioatividade contra o protozoário *T. cruzi*. Segundo Simões et al. (2010), os fitofármacos referem-se à metabólitos secundários de plantas que apresentam uma determinada atividade farmacológica, podendo ou não apresentar uma aplicação terapêutica. Logo, a aplicação de procedimentos fitoquímicos biomonitorados de extratos de plantas, bem como a elucidação estrutural e estudo farmacológico de fitofármacos, referem-se à processos fundamentais para a descoberta de novos fármacos, pois são responsáveis pelos avanços tecnológicos de produção de novos medicamentos alopáticos e fitoterápicos (FERNANDES, 2020), cuja aplicação também pode ser válida para o desenvolvimento de novos meios terapêuticos para a doença de Chagas.

Apesar da carência de relatos bibliográficos a respeito da possível atividade da espécie *Sechium edule* (Jacq.) Sw. contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, pesquisas laboratoriais antecedentes relatam uma ação positiva para algumas flavonas presentes na composição desta espécie contra o patógeno em questão (UCHIYAMA, 2009; IZUMI et al., 2011). Popularmente conhecida como chuchu, a espécie *Sechium edule* é conhecida na medicina tradicional por apresentar uma vasta composição nutricional e propriedades farmacológicas, principalmente relacionadas a problemas de hipertensão, renais, intestinais e entre outros (VÁSQUEZ, 2008). Deste modo, a realização de pesquisas que evidenciam a presença destas substâncias ativas sobre o *T. cruzi* em extratos *S. edule*, preparados por diferentes metodologias, faz-se necessária, justamente para verificar se a referida espécie apresenta uma bioatividade contra o protozoário, fato este que justifica o interesse de estudo da presente pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A presente pesquisa objetiva realizar o preparo, caracterização química e avaliação da possível bioatividade de diferentes extratos de *Sechium edule* contra o *Trypanosoma cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar o preparo de extratos vegetais das folhas secas e frescas, bem como do fruto, da espécie *Sechium edule*, empregando-se as técnicas de extração por maceração e Soxhlet em diferentes solventes (etanol e diclorometano);
- ❖ Determinar o perfil químico dos extratos preparados por intermédio da aplicação das técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS), verificando também se nestes extratos há a presença de flavonoides relatados na literatura como sendo ativos sobre o *Trypanosoma cruzi*.
- ❖ Realizar bioensaios *in vitro* dos extratos brutos de *S. edule*, a fim de verificar a bioatividade destes contra células do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O *Trypanosoma cruzi*

Classificada como uma das doenças endêmicas que acometem o território da América Latina, a doença de Chagas caracteriza-se como uma infecção sistêmica de evolução crônica causada pelo protozoário flagelado da espécie *Trypanosoma cruzi*. Considerada como uma patologia tropical negligenciada, a doença de Chagas foi pela primeira vez descrita pelo médico cientista brasileiro Carlos Chagas em 1909, o qual identificou seu agente etiológico, ciclo de biológico de vida, bem como os vetores responsáveis por sua transmissão (WHO, 2024).

De maneira geral, a via de propagação vetorial é considerada a de maior relevância epidemiológica para os quadros clínicos de infecção chagásica, correspondendo a cerca de 80% dos casos da patologia, sendo os insetos da Família dos triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, os responsáveis por sua transmissão nos hospedeiros vertebrados. Apesar da relevância da transmissão vetorial, a via oral e vertical de propagação, bem como a via transfusional, também se caracterizam como outras rotas de disseminação do agente atualmente, principalmente nas que acometem as áreas urbanas (SANTOS e FALCÃO, 2020).

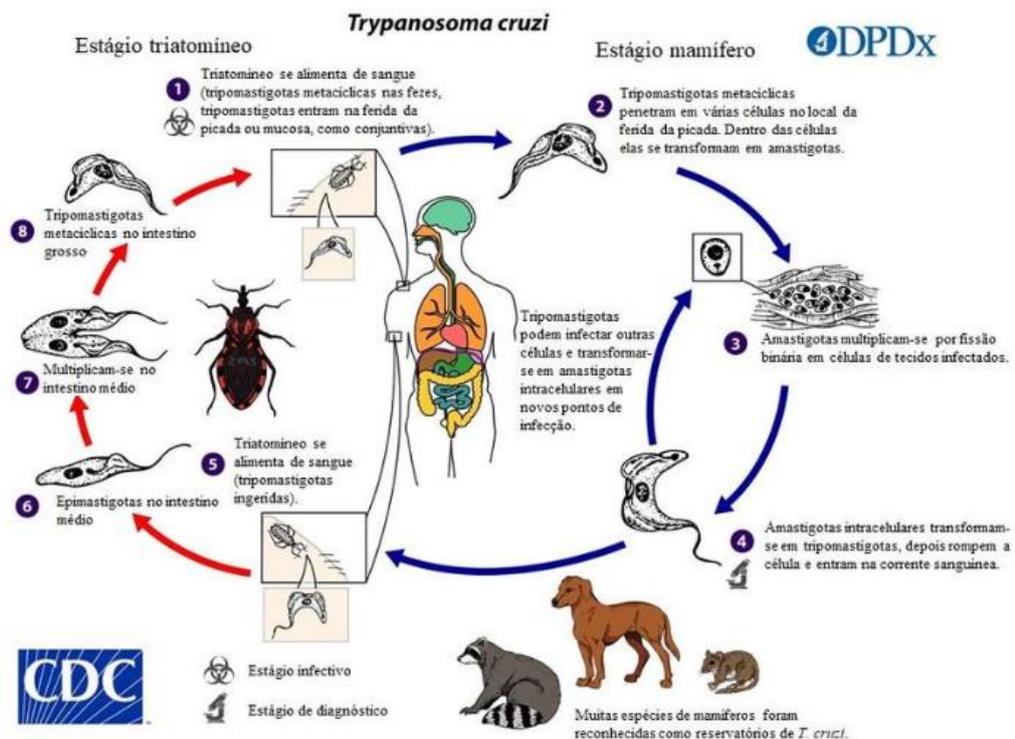
Historicamente, o primeiro quadro clínico de infecção chagásica citado no homem ocorreu em 14 de abril de 1909, onde o médico e cientista Carlos Chagas, até então assistente de pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz, ao examinar uma criança febril de dois anos de idade, identificou um tripanosoma flagelado do mesmo tipo que havia encontrado antes no tubo digestivo de insetos barbeiros. Diante disso, Chagas decidiu por estudar mais profundamente o parasito, enviando amostras de barbeiros para o laboratório do Instituto. Ao promover ensaios de infecção do protozoário em micos, o médico confirmou sua hipótese que este tripanosoma seria uma nova espécie circulante entre barbeiros, mamíferos e humanos. Logo, em homenagem a Oswaldo Cruz, Carlos Chagas nomeou essa nova espécie de *Trypanosoma cruzi*, descobrindo também uma nova doença humana: a tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas (COSTA et al., 2018).

A incidência desta infecção, portanto, mostrou-se ao longo dos anos de grande relevância social. Isto pois, a doença de Chagas exemplifica claramente os efeitos resultantes das modificações e intervenções do homem para com o meio ambiente, visto que o parasito *T. cruzi* era originalmente restrito ao ambiente silvestre, acometendo somente mamíferos do habitat natural através de seu inseto vetor ou por via oral, por intermédio consumo de vetores e mamíferos infectados. Dessa forma, foi justamente a intervenção humana nesses ecossistemas a responsável por fazer com que sua própria espécie fosse inserida no ciclo epidemiológico da doença. Além disso, os quadros clínicos de infecção chagásica também são estritamente

correlacionados à problemática da desigualdade social e deficiências na qualidade de vida da população interiorana da América Latina, onde é estimado cerca de 16 a 18 milhões de pacientes infectados e uma população de oitenta milhões de indivíduos em situação de risco de infecção. Este fato, portanto, se deve às condições de moradia das comunidades carentes do interior, das quais usualmente podem servir de habitat para insetos triatomíneos que hospedam o *Trypanosoma cruzi* (VINHAES e DIAS, 2000).

O ciclo biológico de vida do agente etiológico *Trypanosoma cruzi* é marcado por apresentar uma complexa evolução de suas formas no interior das células de seus hospedeiros invertebrados (vetores do gênero *Triatominae*) ou vertebrados (homens, morcegos, cães, gatos, entre outros mamíferos). Biologicamente, tal ciclo é caracterizado por apresentar uma sequência de quatro formas evolutivas do protozoário: tripomastigotas, amastigotas, epimastigotas e esferomastigotas, conforme representado na figura 1. Dentre elas, somente as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito são desenvolvidas em seus hospedeiros vertebrados, sendo, portanto, utilizadas como marcadores para a identificação laboratorial da doença (COSTA et al., 2018).

Figura 1 - Ciclo biológico de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Research gate (2021).

Durante o ciclo biológico evidenciado na figura acima, a fase humana da infecção inicia-se primeiramente quando um inseto triatomíneo pica um ser humano, depositando suas fezes

contendo a forma tripomastigota metacíclica do parasita. Os protozoários então penetram através da pele humana pelo local da picada, ou através de uma mucosa, e invadem várias células próximas ao ponto de entrada, onde se transformam em amastigotas. Tais células amastigotas, portanto, se multiplicam por divisão binária e se transformam novamente em tripomastigotas, causando a lise das células hospedeiras e entrando na corrente sanguínea. Assim, o parasita pode, então, infectar novas células, onde se transforma novamente em amastigota, reiniciando o ciclo, ou ser ingerido por um novo vetor durante a alimentação no sangue do hospedeiro. Caso esta última opção aconteça, o ciclo vetorial começa, onde, no intestino médio do vetor, a forma tripomastigota se transforma em epimastigota e começa a se replicar. Neste mesmo local, as células epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, que são então excretadas nas fezes do vetor, reiniciando um novo ciclo de infecção humana (SANTOS e FALCÃO, 2020).

Quanto às manifestações clínicas da doença, a infecção chagásica é marcada por apresentar um curso clínico bifásico, com uma fase aguda, podendo ser assintomática ou sintomática, e uma fase crônica, podendo esta, ser manifestada após vários anos da infecção. Nesse sentido, após um período de incubação, inicia-se a fase aguda da doença, que dura de seis a oito semanas. Embora a maioria dos pacientes não apresente sintomas iniciais, alguns podem apresentar sinais de febre, mal-estar, dores musculares, vômitos e diarreia. Em certos casos, sinais de infecção local também podem surgir, como o sinal de Romana (inchaço indolor na pálpebra) e o Chagoma (nódulo eritematoso em outras partes da pele). Geralmente, a fase aguda da doença se resolve espontaneamente e sem tratamento, deixando, posteriormente, o paciente cronicamente infectado. Assim, a maioria dos infectados desenvolvem a forma indeterminada da doença, caracterizada pela ausência de sintomas, mas com soropositividade para *T. cruzi*. Já na fase crônica sintomática, alguns pacientes, após anos assintomáticos, podem desenvolver complicações cardiovasculares e digestivas devido a alterações anatômicas no miocárdio e no tubo digestivo. Dessa maneira, a forma crônica cardíaca da doença é a mais significativa devido à alta taxa de mortalidade, causada por danos no sistema de condução e insuficiência cardíaca por miocardite nos casos graves, enquanto as manifestações gastrointestinais ocorrem em 15-20% dos pacientes, incluindo a dilatação do trato gastrointestinal (WHO, 2024).

O diagnóstico da doença, por outro lado, pode ser realizado nas diversas fases da infecção. Durante a fase aguda, o método diagnóstico mais sensível é por intermédio da detecção do material genético do *T. cruzi* através da reação em cadeia de sua DNA polimerase. No entanto, há outros métodos de diagnóstico que incluem: hemocultura, observação direta do

parasita no sangue periférico e biópsia de órgãos afetados. Ainda, nesta fase inicial da doença, já é possível detectar alterações eletrocardiográficas, principalmente em pacientes com miocardite. A forma indeterminada da doença é caracterizada por sorologia positiva ou evidência parasitológica da infecção, mas sem sinais ou sintomas evidentes, nem alterações no eletrocardiograma ou radiografia de tórax. Podem ser observadas pequenas alterações em exames mais sensíveis, como ecocardiografia, ressonância magnética cardíaca, biópsia endomiocárdica, etc. Já durante a fase crônica, os métodos diagnósticos mais eficazes envolvem a detecção de anticorpos contra o agente etiológico. Assim, as principais técnicas utilizadas incluem imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático (ELISA) e hemaglutinação indireta (SANTOS e FALCÃO, 2020).

Além dos problemas associados à questão social da doença de Chagas, bem como aos fatores envolvidos aos sintomas e diagnósticos dos seus pacientes, uma outra grande problemática associada à infecção chagásica são os métodos terapêuticos da patologia (VINHAES e DIAS, 2000). Isto porque, apesar dos avanços alcançados nas últimas décadas, o tratamento da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz. Embora várias drogas tenham sido estudadas, nenhuma conseguiu eliminar completamente a infecção pelo *T. cruzi* e proporcionar sua cura definitiva para sua fase crônica, elas apenas corroboram para efeitos supressivos. Ademais, apesar de que tenham sido testadas diversas drogas para o tratamento da infecção, até o momento, apenas dois compostos ativos mostraram resultados favoráveis: o nifurtimox e o benznidazol, sendo o benznidazol o único utilizado atualmente no Brasil (WHO, 2024). Este fator, portanto, evidencia a necessidade de uma maior atenção por parte dos governos e órgãos de saúde públicos para com o investimento em pesquisas sobre a doença, a fim de colaborar para a descoberta e desenvolvimento de métodos alternativos mais eficazes para a cura da doença de Chagas.

3.2. PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

3.2.1 Plantas medicinais e fitofármacos

Conceitualmente, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022), as plantas medicinais são definidas como espécies de plantas capazes de atuar no organismo de forma a exercer uma função sob determinada enfermidade, seja na sua prevenção, tratamento ou até mesmo cura. Constituídas como práticas milenares da humanidade, o uso deste tipo de espécies estabeleceu-se em observações empíricas e procedimentos populares de comunidades tradicionais para o desenvolvimento da produção de remédios caseiros e comunitários (FERNANDES, 2020).

Analogamente, é de conhecimento científico que os princípios ativos terapêuticos destas espécies de plantas estão estritamente relacionados à presença de componentes químicos oriundos de sua biossíntese, sendo denominados cientificamente como metabólitos secundários, também chamados de produtos naturais (DEWICK, 2009). O avanço de pesquisas ao longo das últimas décadas possibilitou, portanto, um melhor entendimento das ações terapêuticas promovidas pelos extratos vegetais, de maneira a assimilar as relações de biossíntese de metabólitos das espécies vegetais com o ambiente em que se encontram (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

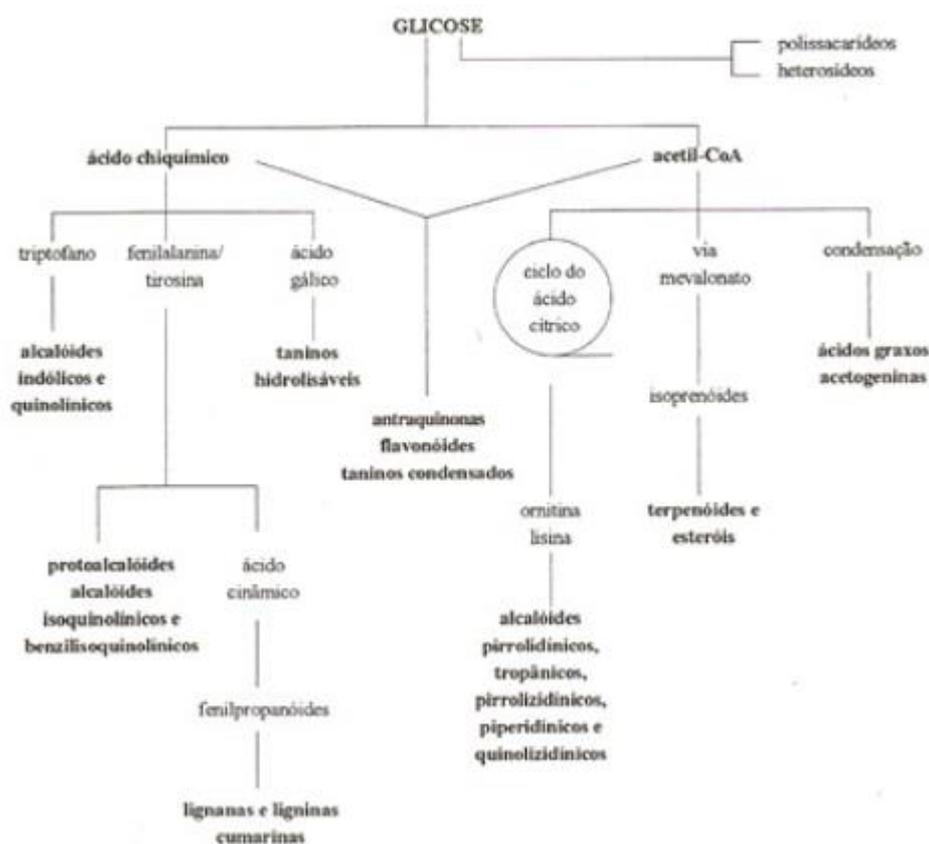
Para a garantia da vida, crescimento e reprodução, todos os organismos vivos necessitam de converter um vasto número de compostos orgânicos, com a finalidade de fornecer energia para a construção de seus tecidos e sistemas. Com o intuito de alcançar este fim, os seres possuem uma rede integrada de trabalho bioquímico, no qual é mediado por enzimas e reações calóricas, denominada de metabolismo intermediário. Nesse sentido, as vias envolvidas neste tipo de metabolismo são denominadas vias metabólicas, das quais seus produtos gerados são intitulados como metabólitos (DEWICK, 2009). Dentre esta vasta rede de substâncias produzidas pelos organismos vivos, são chamados de metabólitos primários àqueles considerados essenciais à vida e comuns à quase totalidade dos organismos vivos, como os carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (SILVA, 2013).

Além das vias metabólicas primárias, há também um segmento metabólico mais limitado na natureza: os metabólitos secundários, que são encontrados em apenas alguns organismos específicos, como as plantas e os microrganismos. Embora não se enquadrem como essenciais para o organismo produtor, os produtos naturais garantem certas vantagens para sua sobrevivência, possuindo vias bioquímicas únicas, das quais concebem elementos de diferenciação entre as espécies. Dentre as funções específicas que tais classes de compostos exercem nos seres, destacam-se: a proteção das plantas contra herbívoros e patógenos, atração de agentes polinizadores, microrganismos simbiotes, entre outros (DEWICK, 2009). Outrossim, o metabolismo secundário é caracterizado por ser demasiadamente influenciado pelo ambiente em que se encontra. Logo, as rotas sintéticas são diferenciadas para a produção de novas substâncias dependendo das variações dinâmicas do ambiente, como por exemplo alterações de pH do solo, umidade, localização (latitude e longitude), estações do ano, entre outros (SILVA, 2013).

Ainda, a complexidade química dos milhares tipos de produtos naturais os permitem ser subdivididos em classes específicas, de acordo com determinadas características em comum, como estrutura química, rotas sintéticas e entre outros (DEWICK, 2009). Segundo Peres

(2004), o metabolismo secundário é responsável pela síntese de três principais grupos de metabólitos: os *compostos fenólicos* (que abrangem, dentre diversas sub-classes como os flavonoides, flavonas, ligninas e taninos); os *terpenos* (constituíntes principalmente de óleos essenciais, esteroides, saponinas e carotenóides); e os *alcaloides*, *protoalcaloides* e *pseudoalcalóides* (compostos que apresentam pelo menos um átomo de nitrogênio em sua estrutura). A Figura 2 ilustra estes principais grupos de metabólitos secundários, relacionando-os com suas respectivas vias de biossíntese.

Figura 2 - Principais classes de metabólitos secundários e suas vias de biossíntese



Fonte: Simões et al (2010).

Em virtude de seus processos de adaptação ao meio, muitas vezes tais produtos naturais apresentam uma bioatividade sobre outras espécies de organismos vivos. Assim, para estes tipos de metabólitos bioativos que apresentam uma função farmacológica, foi designado uma nova nomenclatura, denominando-os de fitofármacos que, segundo Simões et al. (2010), “são substâncias extraídas de plantas, que apresentam atividade farmacológica, podendo ou não apresentar aplicação terapêutica”.

3.2.2 Plantas medicinais utilizadas na história para tratar infecções por patógenos

A utilização de plantas medicinais pelo homem é datada ao longo da história há milhares de anos nas sociedades tradicionais. Durante a antiguidade, o emprego deste tipo de técnica, embora estreitamente associada à visão espiritual, ocasionou nas observações empíricas que levaram ao conhecimento das propriedades farmacêuticas de diversas espécies de plantas semeadas pelas civilizações (FERREIRA et al., 2014).

Historicamente, o tratado mais antigo encontrado sobre as ervas medicinais data-se em 1550 a.C., do qual descreve um compilado de ervas terapêuticas utilizadas pelos povos egípcios. Na renascença, a popularidade da alquimia corroborou para estudos mais direcionados sobre as observações das propriedades farmacológicas de determinadas espécies de plantas, sendo desenvolvidos diversos tipos de medicamentos caseiros. Na era moderna, com o surgimento da química medicinal, foram realizados estudos para o isolamento de diversas substâncias químicas oriundas de espécies vegetais, como a morfina da papoula (*Papaver somniferum*), por exemplo (FERREIRA et al., 2014).

Logo, esses avanços científicos ocasionaram o surgimento de um novo olhar técnico sobre as plantas medicinais, das quais constituíam-se, até então, como a principal fonte de cuidado à saúde do homem. Este cenário muda, portanto, com as implicações da Segunda Guerra Mundial onde, com o desenvolvimento tecnológico da indústria farmacêutica, tais ervas passaram a constituir-se apenas como o insumo primordial para a produção de medicamentos sintéticos, agora sendo estes os protagonistas das práticas de cura da medicina ocidental (SCARAVELLI, 2018).

No entanto, paralelamente com o desenvolvimento da indústria farmacêutica de medicamentos alopáticos na contemporaneidade, surgiu-se também um ramo muito importante das ciências farmacêuticas direcionado para a área das ervas medicinais, a química de produtos naturais: uma ciência multidisciplinar que visa a identificação e extração de metabólitos secundários bioativos, verificando-se também suas propriedades toxicológicas, físico-químicas e farmacológicas (SIMÕES et al., 2010). Além disso, a etnofarmacologia constitui-se como uma subárea importante da farmacognosia que, em seu âmbito conceitual, é uma disciplina dedicada ao estudo do complexo conjunto de relações das plantas com as sociedades humanas de diferentes espaços de tempo. De maneira mais específica, tal ciência investiga os componentes presentes nas plantas medicinais utilizados em sistemas tradicionais da medicina,

sendo este segmento amplamente utilizado como ferramenta de busca de substâncias ativas presentes nas plantas de uso popular terapêutico (SIMÕES et al., 1999).

Outrossim, atualmente apesar de haver um uso generalizado de drogas sintéticas, ainda é perceptível a popularidade da utilização de plantas medicinais entre diversas comunidades tradicionais, bem como a transmissão intergeracional dos conhecimentos da medicina popular destas ervas entre raizeiras e benzedadeiras (FERNANDES, 2020). Um estudo feito por Oliveira et al. (2011) destaca que cerca de 65% da população mundial ainda emprega ervas naturais como fontes da medicina tradicional, sendo este um recurso mais acessível principalmente nos países em desenvolvimento.

As plantas medicinais e os fitofármacos, portanto, configuram-se como uma fonte alternativa terapêutica e complementar em relação aos medicamentos sintéticos. A cultura de hipermedicalização da sociedade contemporânea ocasiona reflexões a respeito dos malefícios oriundos do consumo irracional de medicamentos alopáticos, pois a necessidade quase coletiva e irracional de uma população ser medicada a todo contato com um profissional da saúde está atrelada a diversos tipos de complicações. A primeira delas é associada ao fato de que, segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 50% dos medicamentos são prescritos e vendidos de maneira incorreta, sendo, por conseguinte, utilizados inadequadamente pelos pacientes. Tal relação, por sua vez, impõe condições maléficas ao organismo humano, uma vez que a utilização errônea de alopáticos concebem efeitos colaterais, bem como o surgimento de outras disfunções à saúde do homem. A segunda intercorrência provocada pelo emprego excessivo deste tipo de fármaco se deve ao seu potencial descarte indevido por parte da população, fato este que ocasiona o complexo problema da contaminação de efluentes de redes de esgoto (CORRÊA, 2016).

À vista disso, a conscientização da população a respeito desta problemática corroborou para um aumento da procura de tratamentos menos agressivos, mais naturais e de menor custo, o que ocasionou na popularidade de recursos terapêuticos a partir de extratos vegetais (SINGI et al. 2005). Outrossim, esta mesma procura por tratamentos mais naturais motiva, de maneira simultânea, uma maior valorização da flora brasileira e dos patrimônios bioculturais, uma vez que são estipulados cerca de 170 a 210 mil espécies em sua biota (SIMÕES et al., 2010). Logo, tal perspectiva exhibe o potencial interesse e necessidade de aprofundamento nas pesquisas relacionadas à farmacognosia e química dos produtos naturais.

3.2.3 Fatores que afetam a composição dos extratos vegetais

De maneira conceitual, os extratos vegetais de plantas medicinais referem-se a preparações/soluções de matérias primas vegetais cuja constituição é feita pelos fitofármacos da respectiva espécie medicinal associados a outros componentes químicos de polaridades semelhantes ao solvente extrator utilizado (TOMASI, 2021). São diversos os constituintes químicos presentes em uma fração vegetal. Em uma folha vegetal, por exemplo, podem estar presentes moléculas de clorofila, água, metabólitos primários, metabólitos secundários tóxicos, bem como os respectivos fitofármacos de interesse. O processo de extração e produção de extratos vegetais, portanto, tem o objetivo de promover a separação seletiva dos metabólitos efetivamente relacionados ao efeito farmacológico das demais substâncias indesejadas da respectiva espécie (LEITE, 2009).

Existem diversos fatores responsáveis pela alteração da composição química dos extratos vegetais, que variam desde os aspectos da coleta da espécie até os procedimentos de remoção do solvente extrator. Em termos técnicos, a coleta da espécie vegetal deve ser realizada considerando-se os fatores extrínsecos do ambiente que induzem uma maior produção dos metabólitos de interesse, como o local e horário de coleta, estação do ano etc. (SIMÕES et al., 2010). A segmentação do material vegetal também se refere a um fator importante, uma vez que proporciona uma maior superfície de contato com o solvente extrator, corroborando para uma maior eficiência da extração. Reações de oxidação e degradação são indesejáveis para esta operação, podendo ocorrer quando se tem uma exposição indevida da droga vegetal com o ar ou na ocorrência de rupturas dos tecidos vegetais (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

A secagem da fração vegetal, por sua vez, também pode apresentar vantagens para o procedimento de extração (a depender das características dos produtos naturais que se desejam ser extraídos). Isto pois, ao se diminuir o conteúdo de água é corroborada a concentração preliminar dos metabólitos, facilitando-se o processo de difusão destes para o solvente extrator, bem como há o retardamento da degradação destes, uma vez que, pela baixa atividade de água, evita-se o crescimento microbiano, reações enzimáticas e hidrólise de tais produtos (LEITE, 2009).

A determinação do método de extração mais adequado a ser utilizado na extração de fitofármacos depende diretamente de alguns fatores primordiais, como a sua eficiência, natureza da espécie vegetal de partida, tipo de interesse de obtenção (completa ou parcial) dos metabólitos, bem como as respectivas estabilidades destes (TOMASI, 2021). Nesta operação, para melhor eficiência de extração, na escolha do solvente extrator ideal devem ser levadas em consideração as afinidades químicas deste com os metabólitos de interesse, bem como as

constantes dielétricas entre soluto e solvente devem ser semelhantes. Ainda, fatores como pH, temperatura, agitação e tempo de extração também são primordiais neste procedimento, os quais são capazes de alterar diretamente a seletividade do processo e efetividade de extração das substâncias de interesse (LEITE, 2009).

Atualmente, são diversos os métodos existentes para promover a extração de metabólitos secundários. As técnicas extrativas, nesta perspectiva, baseiam-se em operações unitárias de transferência de massa, das quais são aplicadas ao fenômeno de difusão. Assim, os componentes químicos de interesse são retirados da matéria-prima vegetal por intermédio de sua afinidade química com o solvente selecionado. Tal matéria, portanto, pode ser extraída com a aplicação de diferentes mecanismos, sejam eles a frio (como a maceração, percolação e turbo-extração) ou a quente (a exemplo da infusão, decocção e Soxhlet). Ainda, estes procedimentos são classificados quanto à sua capacidade de esgotamento do vegetal, sendo eles exaustivos, dos quais retiram quase a totalidade da substância desejada, ou não exaustivos, cuja extração é parcial (SIMÕES et al., 1999). A Tabela 1 correlaciona alguns dos variados métodos extrativos comumente utilizados com a sua classificação de eficiência de extração.

Tabela 1 - Relação entre alguns métodos extrativos com sua capacidade de esgotamento da matéria-prima vegetal

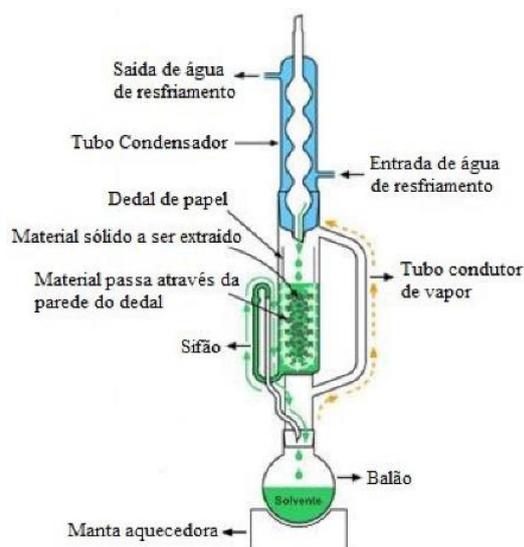
Tipos de extração	Métodos
Exaustivo	Percolação
	Turbo-extração
	Soxhlet
Não exaustivo	Maceração
	Infusão
	Decocção

Fonte: Adaptado de Tomasi (2021).

Os métodos empregados neste estudo, a maceração e a extração por Soxhlet, constituem-se das técnicas mais comumente empregadas na área de química de produtos naturais. Caracterizada por ser um método de extração não exaustivo, a maceração baseia-se em manter a matéria-prima vegetal em contato com o líquido extrator, em um recipiente fechado e sobre o abrigo de luz. O sistema em questão deve ser submetido à temperatura ambiente, sob agitação ou não, em um período pré-estabelecido. Nesta perspectiva, a técnica é definida como não exaustiva pois, em seu mecanismo de atuação, há um equilíbrio difusional

entre o agente extrator e as células da planta de estudo, sem que haja a ruptura da parede celular e membranas do material vegetal. Além disso, por não se tratar de um método de extração à quente, a maceração possui a vantagem de não corroborar para perdas de metabólitos termolábeis e voláteis da planta (TOMASI, 2021).

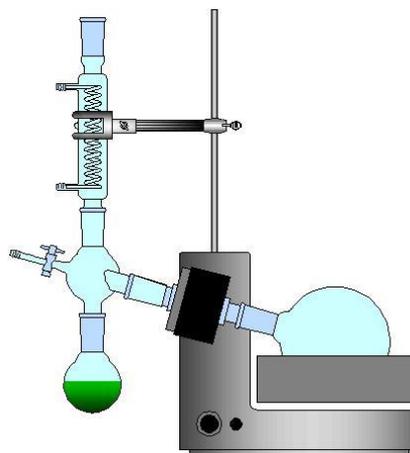
Em contrapartida, a extração por Soxhlet, cujo instrumento é evidenciado na Figura 3, caracteriza-se por constituir-se de uma técnica de destilação adaptada. Nesse sentido, é um procedimento realizado a quente, cujo solvente extrator volátil é capaz de extrair os analitos de interesse, de acordo com suas afinidades químicas. Em sua montagem, a matéria-prima vegetal é empacotada e inserida em uma câmara extratora do aparelho, enquanto o solvente extrator é submerso a um balão de destilação, sob aquecimento. Ao entrar em ebulição, os vapores do solvente extrator são liquefeitos ao atingirem a coluna de condensação, sendo depositados sobre os constituintes vegetais inseridos no aparelho de Soxhlet. Os componentes a serem extraídos, por sua vez, são transferidos ao solvente liquefeito e retirados do equipamento por meio da abertura do sifão localizado na lateral do referido aparelho. Para o reaproveitamento deste ciclo de destilação, o líquido extrativo é retornado ao balão de destilação, de forma a entrar em um novo ciclo de extração, garantindo assim uma maior eficiência do processo e concentração das substâncias de interesse. Dessa forma, devido a tal mecanismo de atuação, a extração por Soxhlet é considerada um método exaustivo, uma vez que o número de ciclos de extração é efetuado de maneira a extrair totalmente ou quase a totalidade dos metabólitos de interesse. Ademais, por se tratar de um método extrativo à quente, o calor promovido pela manta de aquecimento empregada nesta técnica tende a romper a parede celular das células vegetais que envolve os metabólitos presentes no solvente extrator retornado ao balão de destilação, o que corrobora para uma maior facilidade de extração dos produtos naturais. No entanto, o emprego do calor tem a desvantagem de corroborar para a perda de componentes termolábeis e voláteis da amostra (JENSEN, 2007).

Figura 3 - Instrumentação da destilação por Soxhlet

Fonte: Costa et al. (2022).

Em seguida, após o procedimento de extração, a remoção do solvente extrator faz-se necessária com a finalidade de concentrar os metabólitos secundários extraídos do material vegetal de interesse. São diversas as metodologias possíveis de serem empregadas nesta etapa, sendo a concentração por destilação em rotavapor (Figura 4) uma das mais comuns nos laboratórios de química de produtos naturais. Conceitualmente, trata-se de uma destilação à vácuo, na qual a baixa pressão submetida ao sistema corrobora para uma diminuição da temperatura de ebulição do solvente que se quer extrair. Nesse sentido, o aquecimento do processo pode ser realizado de maneira mais branda em um banho maria. A rotação constante do balão de rotaevaporação, submerso no banho quente, é efetuada com o intuito de homogeneizar o aquecimento. Logo, com estas condições, o processo de recuperação do solvente, que é depositado no balão de destilação, é realizado de maneira mais rápida do que em outras destilações convencionais (ENGEL et al. 2011), ocasionando em uma versatilidade para a concentração de produtos naturais.

Figura 4 - Instrumentação do rotavapor



Fonte: Cesar (2011).

3.2.4 Estudos fitoquímicos biomonitorados

O estudo fitoquímico de plantas medicinais refere-se a um processo técnico da área de química de produtos naturais que possui diversas aplicações práticas. O isolamento, seguido pela elucidação estrutural e o estudo farmacológico de fitofármacos de espécies medicinais caracteriza-se como um exemplo de contribuição fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que propicia os avanços tecnológicos de produção de novos fármacos (FERNANDES, 2020). Nesta perspectiva, o procedimento analítico experimental que envolve o isolamento e estudo das estruturas químicas e atividade biológica destes produtos naturais é chamado de estudo fitoquímico biomonitorado, referente à uma série de etapas experimentais que operam um determinado extrato vegetal proporcionando tal objetivo (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

3.2.4.1 Fases do estudo

A sequência experimental de um estudo fitoquímico biomonitorado de um extrato vegetal envolve cinco fases principais: tratamento do material vegetal; preparação e estudo farmacológico do extrato; fracionamento e estudo farmacológico das frações do extrato; isolamento das frações bioativas e determinação estrutural dos fitofármacos isolados (RUSSEL, 2008).

A primeira fase do estudo, portanto, referente ao tratamento do material vegetal, diz respeito aos procedimentos de coleta, amostragem e secagem da matéria-prima vegetal, já mencionados na seção anterior. Seguidamente, há o preparo do extrato da droga vegetal, do

qual deve ser realizado de acordo com as características químicas dos produtos naturais de interesse e objetivos de análise. Assim, um estudo preliminar da bioatividade do extrato é necessário para dar prosseguimento às análises dos metabólitos que o compõem, de forma a verificar se realmente há a existência de fitofármacos nele. Para tal, o extrato preparado é submetido a testes biológicos *in vitro* que analisam sua atividade contra um referido patógeno de interesse ou sobre enzimas ou células envolvidas em processos patológicos (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

Caso o extrato apresente uma atividade positiva contra o alvo de interesse, mesmo que em baixo teor, é interessante promover o fracionamento deste, de maneira a investigar quais de suas frações apresentam os fitofármacos responsáveis pela atividade biológica testada. Segundo Russel (2008), o fracionamento do extrato vegetal diz respeito ao processo de separação das substâncias presentes no conjunto de metabólitos extraídos na etapa anterior de extração. Nesse sentido, este processo é conjuntamente realizado com um monitoramento por ensaios biológicos, a fim de se direcionar as operações de fracionamento para isolar os compostos de interesse das frações que apresentam atividade positiva contra o patógeno de estudo (SIMÕES et al., 2010).

Atualmente, o monitoramento e os processos de fracionamento dos extratos vegetais vêm sendo realizados por intermédio de técnicas instrumentais cromatográficas, que podem ou não ser hifenadas a métodos espectroscópicos e espectrométricos de análise, dos quais possibilitam a identificação dos constituintes químicos das frações do extrato (RUSSEL, 2008).

Primordialmente, a separação física dos componentes químicos presentes nos extratos faz-se necessária para então a posterior identificação das moléculas de interesse (PERES, 2004). À vista deste fator, a cromatografia é um processo físico-químico efetivo de separação, na qual as substâncias a serem segregadas distribuem-se gradualmente em duas fases: uma fase estacionária (que pode ser um composto sólido ou líquido acoplado à um suporte universal) e uma fase móvel (seja ela um solvente líquido ou um gás inerte de arraste). Dessa forma, em seu princípio, as diferentes interações dos compostos químicos presentes na matriz com as fases móvel e estacionária proporcionam um diferente grau de velocidade de eluição, que varia em conformidade com os graus de afinidade química e polaridade das fases. Ao final do processo, é obtido um espectro cromatográfico que identifica os tempos de retenção de cada substância eluída na amostra (COLLINS et al., 2006).

São diversos os tipos e classificações das técnicas cromatográficas de análise, que variam desde a composição da fase estacionária até o mecanismo de partição dos componentes

da amostra pela fase móvel. Para o estudo em química de produtos naturais, a *Cromatografia em Camada Delgada* (CCD), por se tratar de um método eficiente, versátil e relativamente rápido, é utilizada principalmente com o objetivo de promover uma caracterização prévia dos metabólitos e marcadores químicos do extrato a ser analisado (MOREIRA *et. al*, 2010). Nesta técnica, a fase estacionária constitui-se de uma camada fina formada por um sólido granulado (seja ele sílica, alumina, poliamida etc.). Tal sólido é depositado sobre um suporte inerte, podendo ser uma placa de vidro ou de alumínio. Logo, pequenas gotas de solução das amostras do analito são aplicadas em um ponto inferior da placa, deixando-a secar, para então colocá-la em um recipiente contendo a fase móvel. A polaridade e composição de tal fase, por sua vez, deverá ser de acordo com as propriedades do analito. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começa a eluir os analitos pela fase estacionária, sob efeitos de capilaridade, dos quais interagem de maneira específica com cada fase de acordo com seu grau de afinidade. Assim, deixa-se secar a placa após o deslocamento da fase móvel sobre ela, revelando-a posteriormente com um reativo que é capaz de colorir as substâncias de interesse (COLLINS *et al.*, 2006).

De maneira geral, a utilização de um revelador pode ser necessária para a identificação dos analitos incolores eluídos durante o processo. O *fator de retenção* (R_f) de cada substância eluída na amostra, como o próprio nome diz, refere-se à uma grandeza relacionada ao quanto o analito permaneceu retido na fase estacionária, sendo um parâmetro preliminar de identificação do analito. Seu cálculo, portanto, pode ser evidenciado pela razão entre a distância percorrida pelo analito (D_c) e a distância percorrida pelo eluente (D_e) entre o ponto de aplicação e a linha de chegada na placa cromatográfica, conforme prediz a equação 1 (COLLINS *et al.*, 2006).

$$R_f = \frac{D_c}{D_e} \quad (\text{Equação 1})$$

Logo, diante dos pontos supracitados, alguns cuidados importantes são necessários durante a aplicação da técnica, como: escolha das composições das fases móveis e estacionárias (que devem ser compatíveis com as propriedades químicas dos analitos para garantir uma melhor resolução da placa cromatográfica); escolha do tipo de revelador (no qual deve ser apropriado para a identificação do analito de interesse); aplicação da amostra (devendo ser feita de maneira capilar e atentando-se para atingir a concentração ideal da amostra na placa cromatográfica, sem promover a saturação desta) e saturação da cuba cromatográfica com a composição da fase móvel para evitar interferências da atmosfera da cuba; entre outros (PALOSHI; ZENI; LAMPMAN, 1998).

Além disso, determinados reveladores químicos são utilizados para identificação específica das diferentes classes de metabólitos, como terpenos, cumarinas, flavonoides, alcaloides, etc. Logo, por meio de reações químicas características, estes reveladores conseguem identificar a presença de substâncias de tais classes. Para o estudo em questão, foi empregado um revelador de vanilina sulfúrica, sendo as manchas referentes à interação do analito e revelador observadas após o aquecimento da placa. Utilizou-se também um revelador de Produtos Naturais – Polietileno glicol, cuja identificação dos metabólitos é realizada em visualização em luz Ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm (WAGNER; BLADT, 2001).

Para fins de fracionamento dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais, normalmente é empregada a técnica de Cromatografia Líquida em Coluna, bem como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, HPLC) em escala preparativa e semi-preparativa. Nestas técnicas, a fase móvel consiste em um solvente ou em uma mistura de solventes, dos quais sua composição ao longo da eluição pode se dar de maneira isocrática (invariável) ou em gradiente (variável). Os extratos vegetais são então submetidos à uma coluna preparativa de fracionamento, onde ao apresentarem diferentes graus de interação entre fase móvel e estacionária selecionada, há a separação dos componentes do extrato em diferentes tempos de retenção, sendo, portanto, coletados em recipientes individuais à medida que saem da coluna. Esses eluentes coletados em diferentes recipientes contêm os componentes fracionados do extrato vegetal. Após a primeira corrida, tais eluentes podem ser submetidos a uma nova coluna cromatográfica ou a técnicas de fracionamento adicionais, para se obter frações mais puras ou separar componentes mais complexos (RUSSEL, 2008).

As frações dos extratos podem então serem encaminhadas para os respectivos testes biológicos com intuito de averiguar quais destas apresentam atividade positiva contra o patógeno de estudo farmacológico. Em caso de resultado satisfatório, prossegue-se às próximas fases do estudo, onde se dá continuidade às operações de fracionamento a fim de se isolar e purificar os componentes químicos responsáveis por tal atividade. A purificação final dos fitofármacos, portanto, geralmente é acompanhada de técnicas apropriadas como recristalização, sublimação ou até mesmo destilação. Assim, elucidação estrutural das substâncias é viabilizada, podendo ser efetuada mediante a aplicação de técnicas espectroscópicas, como espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis), espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e até mesmo Espectrometria de Massas (EM). Ademais, as técnicas hífenadas, como a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, GC-MS) e

Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, HPLC-MS), possuem o diferencial de possibilitarem a identificação de substâncias em uma determinada amostra sem a necessidade de seu isolamento (RUSSEL, 2008). Os métodos hífenados são amplamente empregados em laboratórios analíticos de diversas áreas, justamente por sua rapidez, alta seletividade e sensibilidade (MOREIRA et al., 2010).

A utilização do GC-MS tem por intuito promover uma caracterização do perfil cromatográfico mais amplo dos extratos da espécie em estudo. Analiticamente, a referida técnica é empregada principalmente para a separação e caracterização de componentes voláteis e termicamente estáveis (COLLINS *et. al*, 2006). Para o trabalho em questão, escolheu-se este método para a análise dos extratos em diclorometano das folhas e frutos chuchu, justamente por este solvente ser capaz em extrair sobretudo metabólitos de baixa polaridade e de maior volatilidade.

Instrumentalmente, em tal técnica hífenada, o cromatógrafo gasoso é responsável por promover a separação dos componentes da mistura complexa da matriz a ser analisada, por intermédio das diferentes interações deste com as fases estacionárias e móvel (neste caso, um gás inerte de arraste). O espectrômetro de massas, por sua vez, é responsável por ionizar e identificar os analitos, separados pelos diferentes tempos de retenção na coluna cromatográfica, utilizando-se o parâmetro da razão massa/carga (m/z) de tais íons percussores e seus respectivos fragmentos. À vista disso, a comparação dos perfis de fragmentação dos íons analitos com os padrões da biblioteca do instrumento possibilita a identificação ampla das substâncias da amostra (COLLINS *et. al*, 2006).

De modo geral, um cromatógrafo gasoso é composto pelos seguintes componentes: um cilindro de gás com regulador de vazão, injetor da amostra, uma coluna cromatográfica, forno de controle de temperatura - do qual sua programação pode ser isotérmica ou em gradiente ao longo da eluição, detector - que gera um sinal proporcional à concentração do analito em seu respectivo tempo de retenção, e um sistema de tratamento de dados. Por se tratar de uma técnica hífenada, os analitos que saem da coluna cromatográfica são então encaminhados para um espectrômetro de massas. Em geral, a composição de um espectrômetro de massas inicia-se pela fonte de ionização, responsável por transformar as moléculas da amostra em íons carregados. No caso do GC-MS, este processo é geralmente feito mediante à uma ionização por impacto eletrônico (EI). Nesse processo, a amostra é bombardeada com elétrons de alta energia, geralmente gerados a partir de uma fonte como filamento de tungstênio. Este impacto provoca a ejeção de um elétron da molécula da amostra, formando um radical catiônico, que é então fragmentado, resultando em fragmentos carregados que podem ser detectados pelo

espectrômetro de massas. Assim, os íons percussores, bem como seus fragmentos, são encaminhados para o analisador de massas. Neste, são acelerados e separados com base em sua razão massa/carga (m/z). Por fim, os íons são detectados por um detector, de forma com que sua abundância relativa seja registrada, sendo posteriormente analisados por um sistema de aquisição de dados, que os compara com a biblioteca do equipamento (SKOOG et al. 2015).

Já o HPLC-MS, a corrida cromatográfica se dá em detrimento de uma fase móvel composta por um solvente ou uma mistura de solventes, com composição invariável (modo isocrático) ou variável (modo em gradiente) ao longo da eluição, responsável por separar componentes pouco voláteis e termicamente instáveis da amostra (COLLINS *et. al*, 2006). Para o respectivo estudo, escolheu-se este método para a caracterização dos extratos etanólicos das folhas e frutos do chuchu, em função da perspectiva de extração do etanol de metabólitos de média à alta polaridade.

Instrumentalmente, um cromatógrafo líquido de alta resolução é composto por um sistema complexo de componentes que operam na finalidade de promover uma eluição rápida, eficiente e isenta de pulsos. Em primeiro plano, há um sistema de injeção em que o solvente ou mistura de solventes de eluição é bombeado, de acordo com sua composição definida, através de um sistema de alta pressão para a coluna cromatográfica. A coluna, por sua vez, é preenchida com uma fase estacionária, que pode ser de diferentes tipos, como sílica, polímeros ou outros materiais. A amostra é injetada no sistema por intermédio de uma válvula de injeção e misturada com o solvente de eluição antes de entrar na coluna. O analito de interesse é separado da matriz da amostra à medida que interage com a fase estacionária na coluna. Assim, no decorrer em que os analitos passam pela coluna, são detectados por um detector, como UV-Vis ou de fluorescência, que gera um sinal proporcional à concentração do analito em seu respectivo tempo de retenção. Este sinal é então registrado e interpretado para determinar a composição da amostra (SKOOG et al. 2015).

Posteriormente, os analitos separados pelo cromatógrafo líquido então são encaminhados para um espectrômetro de massas, que tem como objetivo ionizar os componentes separados da coluna cromatográfica, de maneira a caracterizá-los de acordo com sua razão massa/carga, assim como o padrão de fragmentação destes íons percussores, dos quais são identificados por intermédio de uma comparação com os padrões da biblioteca do instrumento. A composição deste equipamento é basicamente a mesma citada anteriormente para um GC-MS, com exceção do método de ionização empregado. No caso da técnica de HPLC-MS, este processo geralmente é feito mediante à uma ionização por electrospray (ESI), onde os analitos podem ser ionizados em seu modo positivo ou negativo. Nesta técnica, a

amostra é dissolvida em um solvente e injetada através de uma agulha carregada eletricamente. Um campo elétrico de alta voltagem é aplicado, fazendo com que o solvente seja pulverizado em pequenas gotículas, sendo posteriormente evaporizado, e os íons carregados da amostra são então encaminhados para o analisador de massas, onde são acelerados e separados com base em sua razão massa/carga (m/z). Os analisadores comuns incluem os de setor magnético, quadrupolo, TOF (tempo de voo) e etc. Tais íons são então detectados por um detector, de acordo com sua abundância relativa, sendo posteriormente analisados por um sistema de aquisição de dados, que os compara com a biblioteca do equipamento (SKOOG et al. 2015).

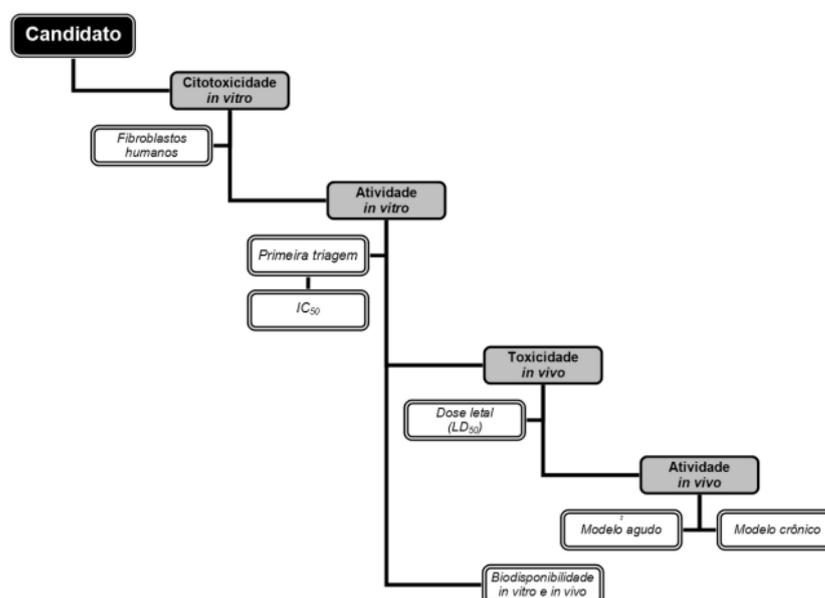
Para a análise do trabalho em questão, o equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência acoplado à um espectrômetro de massas com ionização por electrospray (UHPLC-ESI-MS/MS). Em comparação com um HPLC, o cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência é operado em pressões muito mais altas do que as tradicionais, das quais proporcionam muitas vantagens, dentre elas: maior eficiência de separação, menor tempo de análise e menor consumo de solvente e amostras (LIANG et al. 2019).

3.2.4.2. Ensaios biológicos da atividade anti-*Trypanosoma*

De maneira geral, o processo de identificação de novas drogas caracteriza-se como longo, complexo, oneroso e de muitas fases, sendo também de caráter multidisciplinar. Sabe-se, dessa forma, que a ação dos fármacos envolve sua interação com uma macromolécula receptora biológica da célula alvo, geralmente uma proteína de uma via bioquímica relacionada a uma condição de doença ou disfunção nos seres humanos. No caso da doença de Chagas, os avanços consideráveis para com os estudos de caracterização do genoma do protozoário *Trypanosoma cruzi* corroboraram para a identificação de vários alvos e receptores biológicos de suas células, dos quais são majoritariamente compostos enzimáticos (TEZUKA, 2015).

A identificação biológica para drogas anti-*Trypanosoma cruzi* envolve um complexo protocolo de ensaios *in vitro* e *in vivo*, utilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu programa de pesquisa de identificação de novos fármacos com atividade anti-chagásica, os quais também foram adotados em diversos centros de referência no Brasil (DIAS; DESSOY, 2009). A Figura 5, evidenciada abaixo, esquematiza o processo sequencial dos ensaios biológicos feitos para a triagem de drogas anti- *Trypanosoma cruzi*, que será explicado na sequência.

Figura 5 - Processo sequencial adotado pela OMS para triagem de drogas anti-*Trypanosoma cruzi*



Fonte: Dias; Dessoy (2009).

Baseando-se no processo biológico supracitado, em primeiro plano, a triagem de drogas anti-*Trypanosoma cruzi* inicia-se com uma triagem *in vitro* da atividade da potencial droga. Neste ensaio, o composto promissor é testado em culturas de células infectadas pelo *T. cruzi*, a fim de avaliar sua eficácia para inibir o parasita. Nesta triagem, portanto, a identificação da atividade de inibição do protozoário é realizada por intermédio do marcador enzimático β -galactosidase, que proporciona uma reação catalítica colorimétrica de substratos de corantes adicionados nas placas do ensaio. Posteriormente, caso a triagem preliminar da potencial droga apresente um resultado satisfatório de inibição da cepa do parasito, torna-se necessário determinar a sua concentração inibitória média (IC₅₀), ou seja, a concentração do composto que é suficiente para inibir o parasito em 50% de sua quantidade inicial. Simultaneamente a este procedimento, é averiguada também a citotoxicidade da potencial droga, com o intuito de garantir que ela não seja prejudicial às células humanas. Neste teste são empregados fibroblastos humanos não infectados, de maneira a verificar se a atividade do composto sobre tais células corrobora para sua morte ou danos (BUCKNER et al., 1996).

Em seguida, de posse de resultados satisfatórios nos testes *in vitro* para a droga promissora, o processo sequencial de triagem segue-se para os ensaios *in vivo* em espécies de camundongos. Dessa forma, em primeiro plano, os camundongos selecionados são infectados com uma cepa padronizada de *T. cruzi*, sendo sua quantidade e via de infecção (geralmente

intraperitoneal) cuidadosamente controladas para garantir consistência nos resultados. Logo, a potencial droga é então administrada à espécie infectada, também por via peritoneal. Em segundo plano, são efetuados ensaios de ED₅₀ e LD₅₀, a fim de determinar, respectivamente, a dose eficaz do composto para reduzir a carga parasitária em 50% e a dose letal mínima da droga que produz a morte de 50% das espécies expostas a ela. Vale ressaltar ainda que, durante todo o estudo, a espécie de camundongos é monitorada regularmente para sinais clínicos de doença e para efeitos colaterais potenciais do composto (DIAS; DESSOY, 2009).

Em caso de resultados positivos para os testes *in vivo*, é determinada então a carga parasitária nas espécies infectadas, por intermédio de técnicas como contagem de parasitos no sangue/tecidos dos infectados ou detecção do DNA do protozoário por PCR. Ao final, é verificado a eficácia da potencial droga em reduzir a carga parasitária e sua segurança em termos de toxicidade, de forma com que a margem terapêutica é calculada a partir da relação entre a dose eficaz e a dose letal da droga. Desse modo, àqueles componentes que apresentarem uma alta eficácia contra o *T. cruzi*, bem como baixa toxicidade em modelos animais, são considerados promissores, de forma a poderem avançar para estudos pré-clínicos e para ensaios clínicos em humanos (DIAS; DESSOY, 2009).

3.3 *Sechium edule* E SUAS PROPRIEDADES

Representante da Família Cucurbitaceae, a espécie *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Figura 6), popularmente conhecida no Brasil como chuchu, é uma planta trepadeira, herbácea e perene, com gavinhas e raízes tuberosas. Seus frutos apresentam um formato de pera, dos quais crescem tanto individualmente quanto em pares em um pedúnculo compartilhado. As folhas desta espécie possuem um formato ligeiramente lobado, com três a cinco lóbulos angulares, com margens denticuladas e gavinhas divididas. Taxonomicamente, a *Sechium edule* é classificada como uma Embriófita, de Classe Magnoliopsida, Ordem Violales, Família Cucurbitaceae, gênero *Sechium* e espécie *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (VIEIRA *et. al.*, 2018). O cultivo desta planta é datado desde eras pré-colombianas no continente da América Central, em específico na região do México. Ao longo dos anos, é evidenciado uma domesticação das espécies do gênero *Sechium*, justamente por representarem de elevado valor nutritivo e importância econômica (IÑIGUEZ *et al.*, 2008).

Figura 6 - *Sechium edule* (Jacq.) Sw

Fonte: Ecosostenibile (2022).

Tradicionalmente, esta espécie é amplamente utilizada na culinária mundial, cujo valor nutritivo e versatilidade destacam-se como os fatores que tornam o *Sechium edule* tão popular entre as nações. A possibilidade de consumo das mais diversas partes da planta (tais como frutos, raízes, brotos, etc), bem como seu alto teor de fibras e sais minerais (como cálcio, fósforo, potássio e magnésio) justificam este fato (VÁSQUEZ, 2008). Um estudo feito por Iñiguez *et. al* (2008), ilustrado na Tabela 2, reportou a composição nutricional de diferentes partes da espécie, evidenciando seu alto valor nutritivo.

Tabela 2 - Composição química nutricional da espécie *Sechium edule* (Jacq.) Sw (para 100 gramas de matéria seca)

Composição	Fruto maduro	Semente	Folhas	Raiz
Energia (cal)	26-31	-	60.0	79.0
Umidade (%)	90-94.5	-	89.7	79.7
Proteínas (g)	0.9-1.1	5.5	4.0	2.0
Carboidratos (g)	0.1-0.3	-	0.4	0.2
Lipídeos (g)	3.5-8.4	60.0	4.7	17.8
Fibras (g)	0.4-1.0	-	1.2	0.4
Ca²⁺ (g)	12-19	-	58.0	7.0
P⁺ (mg)	20-27	-	108.0	34.0
Fe²⁺ (g)	0.4-0.8	-	2.5	0.8
Cu²⁺ (g)	8.82	-	-	-
Zn⁺ (g/mL)	8.4	-	-	-
Mn²⁺ (g)	0.47	-	-	-
K⁺ (g/mL)	38.0	-	-	-
Vitamina A (mg)	5.0	-	615.0	-

Ác. ascórbico (mg)	11-20	-	16.0	19.0
---------------------------	--------------	----------	-------------	-------------

Fonte: Adaptado de Iñiguez et al. (2008).

Com relação às suas propriedades farmacológicas, na medicina popular, o chuchu é apontado por propiciar a manufatura de chás com propriedades diuréticas, com indicações para alívio de problemas renais e intestinais (VÁSQUEZ, 2008). Em estudos clínicos, verifica-se uma atividade anti cardiovascular associada à presença de flavonoides na composição da *Sechium edule*. Atividades contra a diabetes e hipoglicemia também são diretamente associadas à composição fenólica, de flavonóides e polissacarídeos presentes nos extratos da espécie (VIEIRA et al., 2018).

Uma atividade antioxidante também é relatada para a planta, da qual é associada à presença de flavonóis e polifenóis. Estudos de extratos de acetato de etila da polpa desidratada do fruto de *S. edule* indicam a atividade antioxidante da isoquercetina e ácido cafeico presentes na composição da espécie. Além disso, a atividade antioxidante dos fitofármacos da espécie tem sido associada com a sua capacidade de inibir alguns tipos de câncer. Outrossim, uma atividade hepatoprotetora é relacionada principalmente devido aos componentes polifenólicos de brotos da planta, que atenuam o acúmulo de lipídeos hepáticos no fígado. Atividades antimicrobianas e antiepiléptica também são relatadas pela literatura (VIEIRA et al., 2018).

3.3.1 Produtos naturais da espécie *Sechium edule*

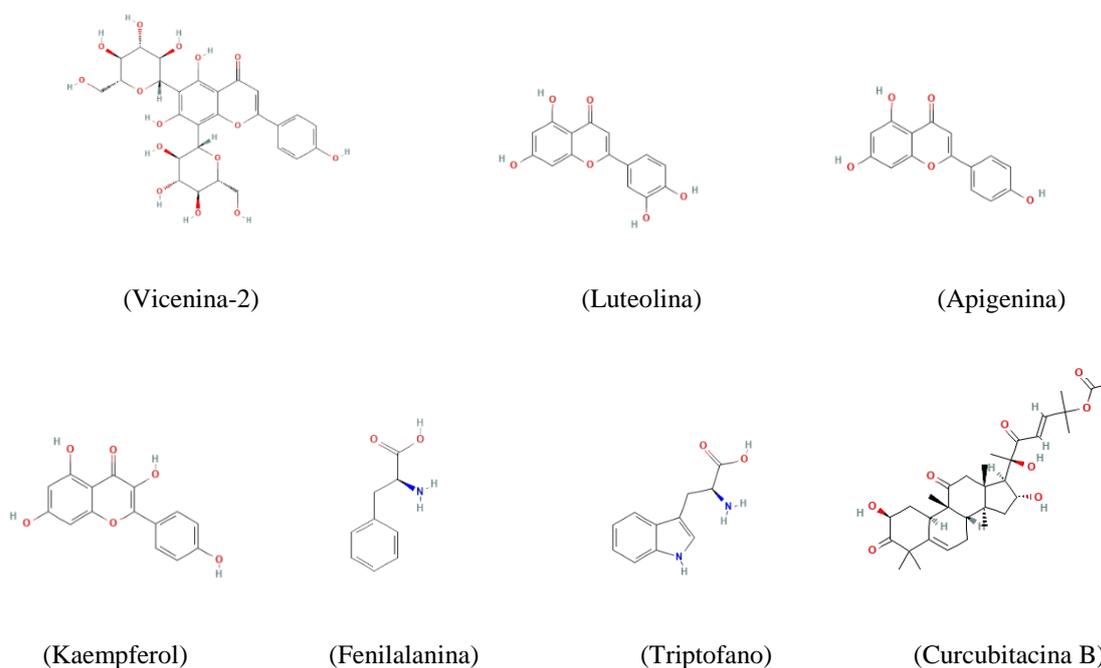
Estudos fitoquímicos da espécie *Sechium edule* relatam a presença de cerca de 64 produtos naturais. Dessa forma, Vieira et al. (2018) descreve a presença de compostos fenólicos, saponinas, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, terpenos e diversos outros produtos naturais, dentre os quais os principais metabólitos já identificados são os compostos polifenólicos: miricitrina; crisoeriol 7-O-rutinosídeo; apigenina 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-apiofuranosídeo; diosmetina 7-O-rutinosídeo; vicenina-2; vitexina; luteolina 7-O-rutinosídeo; luteolina 7 O-β-D-glucosídeo; apigenina 7-O-rutinosídeo; kaempferol-7-O-glucosídeo; kaempferol-3-O-sambubiosídeo; irianterina-E-triacetato I e II. Ainda, alguns ácidos são listados, como: ácido cumárico; ácido palmítico; ácido linoleico; ácido esteárico; ácido oleico; ácido linoleico; ácido α-linoleico; ácido trans-cinâmico; ácido fenilacético; ácido 3-octadecenóico; ácido palmitoleico e ácido fólico (VIEIRA et. al, 2018; ANZHEN et. al, 2021;

CERIO *et. al*, 2019). Como principais componentes voláteis identificados nesta espécie, destacam-se: o ácido octadeca-9,12-dienóico, docosano, oct-1-en-3-ol e *Z*-hex-3-en-1-ol (VÁSQUEZ, 2008).

Vitaminas e carotenóides também são relatadas no estudo fitoquímico da espécie, indicando a presença de vitamina C e β -caroteno. O estudo dos principais aminoácidos presentes em *Sechium edule* também foram pesquisados, sendo eles: triptofano; valina; leucina; isoleucina; fenilalanina; treonina; lisina; trilinoleína; argenina, histidina, tirosina, glicina, serina, metionina (CORONEL *et. al*, 2017). São apontados também esteróis, triterpenos e cucurbitacinas, tais como: 24- etilcolesta-7,22-dienol; 24-etilcolesta- 7-enol; 24-etilcolesta-7,25-dienol; 24-etilcolesta-7,22,25-trienol; 24- metilcolesta-7-enol; α - amirina; cicloartenol; β - amirina; 24-metilenocicloartanol; cucurbitacinas B, E, P e Q1, dihidrocucurbitacinas e isocucurbitacinas (VÁSQUEZ, 2008).

A Figura 7, portanto, evidencia algumas destas principais estruturas.

Figura 7 – Estrutura dos principais metabólitos secundários presentes na composição fitoquímica da espécie *Sechium edule*



Fonte: PubChem (2024)

3.3.2 Interesse em testar a atividade anti-*Trypanosoma* da espécie

De maneira pessoal, as motivações para o estudo da bioatividade da espécie *Sechium edule* contra o *Trypanosoma cruzi* se deve à trabalhos anteriores, realizados no Instituto René Rachou - Fiocruz Minas pela aluna e autora desta monografia, Anna Maria Romano, e pela co-orientadora Tânia Maria de Almeida Alves, na qual estudou-se a composição química de oito espécies de plantas medicinais de uma horta comunitária da comunidade Cabana do Pai Tomás – Belo Horizonte/MG, indicadas por uma raizeira da região para uso popular contra a ansiedade. Com a oportunidade de testar os extratos destas oito sobre patógenos causadores de doenças tropicais, neste estudo preliminar, portanto, somente o extrato etanólico das folhas frescas da espécie *Sechium edule* apresentou um resultado positivo para os testes preliminares *in vitro* contra o *T. cruzi*. Nesta perspectiva, a carência de estudos bibliográficos a respeito da potencial atividade da referida espécie contra o protozoário em questão justifica o interesse em aprofundar o estudo fitoquímico da *Sechium edule* contra o patógeno.

Apesar de não encontrada nenhuma citação direta quanto à atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do chuchu, esta ação foi relatada para algumas flavonas presentes na composição da espécie. Uchiyama N. (2009) descreve em seus estudos a ação positiva da apigenina (Figura 7) contra o protozoário, e Izumi E. et al. (2011) apontam a atividade da luteolina e vicenina-2 (Figura 7). À vista disso, o aprofundamento das pesquisas a respeito da presença destes respectivos metabólitos ativos sobre o *T. cruzi* em extratos de *S. edule*, obtidos em diferentes condições, faz-se necessária, justificando o interesse neste estudo. Além disso, como perspectiva social, em detrimento da carência de tratamentos específicos para a fase crônica da Doença de Chagas, a referida pesquisa pretende verificar o potencial uso de plantas medicinais como recurso terapêutico para tal enfermidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos e vidrarias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram disponibilizados pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MINAS) e pelo Departamento de Química do CEFET-MG, em específico no Laboratório de Química Orgânica Professor Luiz Bernardes e Laboratório de Química Orgânica e Microbiologia Aplicadas (LaQOMAp) do prédio escolar do Campus I do Cefet-MG em Belo Horizonte. Os equipamentos, reagentes e vidrarias utilizadas no respectivo trabalho são listados abaixo.

Equipamentos:

- ❖ Balança de precisão analítica (marca Marte, modelo ATY224).
- ❖ Manta aquecedora (marca Edulab).
- ❖ Estufa de secagem (marca Didática SP, modelo 0800 707 5700).
- ❖ Termômetro de mercúrio de $(100,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.
- ❖ Bomba de vácuo (marca Primatec, modelo 121).
- ❖ Centrífuga à vácuo Savant (marca Thermo Fisher Scientific).
- ❖ Rota evaporador (marca IKA RV, modelo 05 basic).
- ❖ Placas cromatográficas TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ (marca Merck Milipore).
- ❖ Gabinete de Ultravioleta Visível (UV-Vis) (marca Lamag).
- ❖ Cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 7890A GC System) acoplado ao espectrômetro de massas de impacto eletrônico (Agilent Technologies 5975C inert MSD Triple-axis Detector e autosampler 7643) (Shimadzu).
- ❖ Coluna capilar para cromatógrafo gasoso HP-5MS (5% phenyl methyl silox) (30 m x 250 μm x 0,25 μm) (Shimadzu).
- ❖ Cromatógrafo líquido de ultra alta resolução acoplado ao espectrômetro de Massas com ionização por electrospray e detector de tempo de voo (UHPLC-ESI-MS/MS-TOF) (Shimadzu, modelo Nexera).
- ❖ Coluna capilar cromatográfica Shimpack XR-ODSIII (C18, 150 \times 2,0 mm, 2,2 μm) (Shimadzu).

Reagentes:

- ❖ Etanol P.A 99,7% (Marca Chemicals).
- ❖ Diclorometano P.A (Marca Impex).
- ❖ Acetato de etila (marca LS Chemicals).

- ❖ Ácido fórmico (marca Fluka).
- ❖ Ácido acético glacial (marca Merck Milipore).
- ❖ Álcool metílico P.A. (marca Neon).
- ❖ Água miliq.
- ❖ Solução de vanilina sulfúrica (preparada no laboratório QPNB - IRR).
- ❖ Revelador de Produtos Naturais – Polietileno glicol (preparada no laboratório QPNB – IRR).
- ❖ Hexano grau HPLC (marca Honeywell).
- ❖ Ácido fórmico (marca Supelco) e acetonitrila grau HPLC (marca Merck).
- ❖ Metanol grau HPLC (marca Merck).

Vidrarias:

- ❖ Balões de destilação de 500 e 1000 mL (Marca VidroLab).
- ❖ Pérolas de vidro.
- ❖ Vidrarias de destilação – cabeça, longa de vidro, condensador, coluna de vigreux (Marca DiogoLab).
- ❖ Balões de destilação por rotavapor de 500 e 1000 mL (marca VidroLab).
- ❖ Erlenmeyers de 500 mL (Marca VidroLab).
- ❖ Placas de Petri (Marca Vidrolab).
- ❖ Frascos do tipo Âmbar.
- ❖ Tubos de cintilação.
- ❖ Tubos do tipo *ependorf*.
- ❖ Tubos do tipo *vials*.
- ❖ Microtubos tipo *safe lock*.

4.2 COLETA E TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL DA ESPÉCIE *Sechium edule*

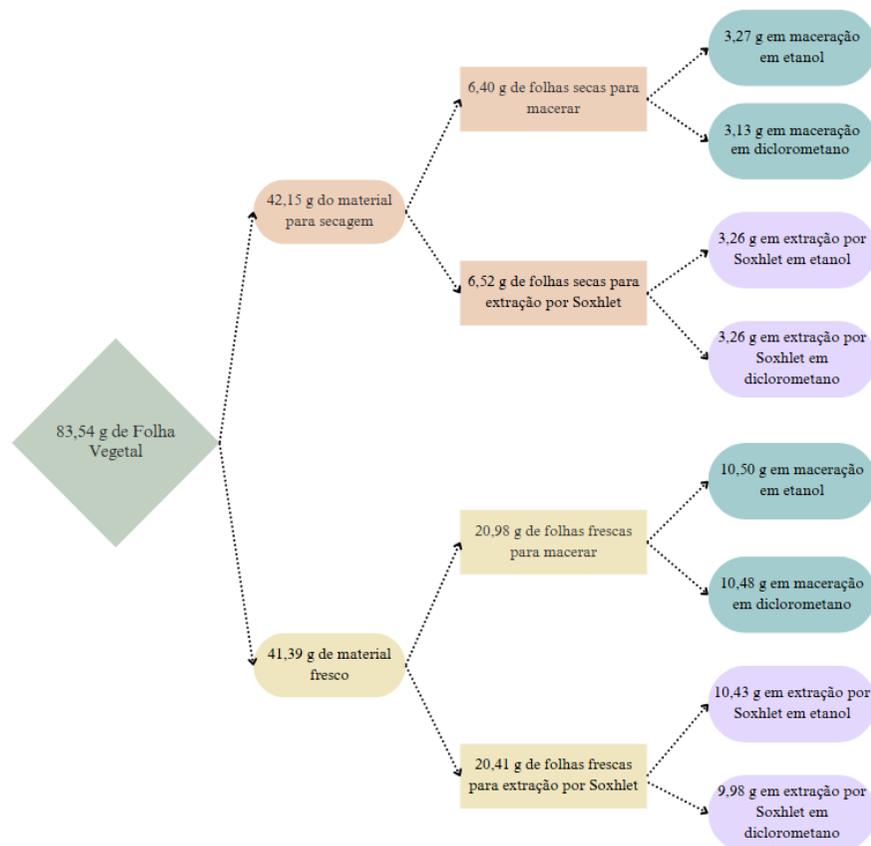
A coleta das folhas e frutos da espécie *Sechium edule* foi efetuada em indivíduos distintos, nas coordenadas 19°49'40.8''S / 43°9'32.4''W e 20°21'26''S / 43°59'52''W, respectivamente, aproximadamente às 8:00 h, do dia 09 de abril de 2023. O procedimento de coleta foi executado de maneira sistemática, por intermédio da retirada de ramos, folhas e frutos, cortados a aproximadamente 30 cm do solo, conforme é indicado pela bibliografia de Simões et al. (2010). Posteriormente, as amostras vegetais foram armazenadas adequadamente em geladeira durante um período aproximado de 5 dias, para a posterior extração de seus metabólitos.

As folhas foram separadas em duas porções. Uma destas porções que continha cerca de 42,15 g, pesadas em balança analítica, foi submetida à secagem natural, para qual as folhas foram espalhadas em uma bandeja de plástico, permanecendo-se por 7 a temperatura ambiente. De maneira análoga, metade da massa do fruto do chuchu foi submetida à uma secagem em estufa de aquecimento, para posterior comparação do perfil dos extratos do fruto fresco e seco. Para tal, fatiou-se o fruto e pesou-se em balança analítica de forma a submeter cerca de 56,94 g para a estufa para secagem. O processo de secagem então foi realizado por um período de tempo de aproximadamente 4 h, em temperatura aproximada de 70°C, até que se obtivesse uma massa constante da parcela de frutos secos.

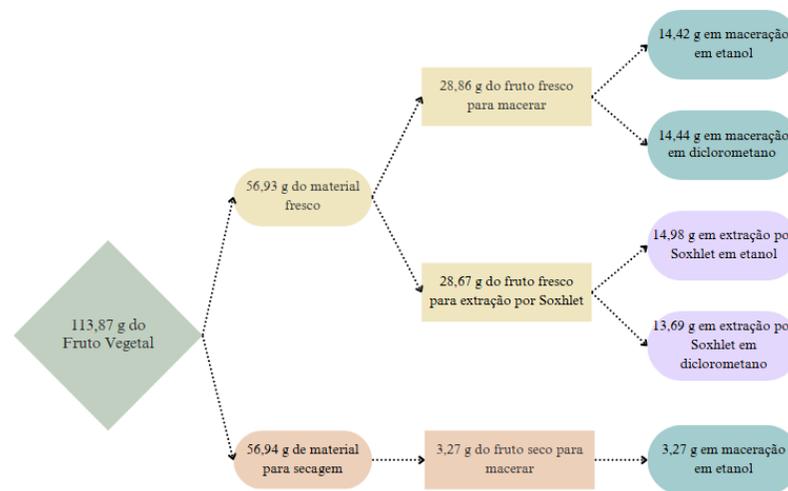
Após a secagem, efetuou-se o fracionamento das folhas secas e frescas de chuchu, a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente extrator. Conforme indicado por Leite (2009), picotou-se manualmente ambos os tipos de folhas da espécie, reservando-os em placas Petri, devidamente taradas.

Dividiu-se homogeneamente cada material vegetal das folhas secas e frescas em quatro partes, respectivamente, e pesou-se os em balança analítica de precisão. Ressalta-se que, a quantidade de cada fração vegetal foi subdividida de maneira homogênea para serem submetidas aos dois procedimentos de extração (maceração e extração por Soxhlet) por dois solventes extratores distintos (diclorometano e etanol). Para melhor elucidação do procedimento, o Esquema 1 representa como foi realizada a divisão dos materiais vegetais devidamente tratados.

Analogamente, as porções frescas do fruto da espécie também foram divididas em quatro frações iguais, respectivamente, para serem submetidas aos dois diferentes procedimentos de extração por dois solventes distintos (etanol e diclorometano). A porção seca do fruto de chuchu, por sua vez, devido à grande perda de massa durante a secagem, somente foi submetida à um processo de maceração utilizando-se etanol como solvente extrator. Ressalta-se que as respectivas massas do fruto foram pesadas em balança analítica. O Esquema 2 ilustra tal procedimento.

Esquema 1 - Tratamento das folhas de *Sechium edule*

Fonte: Autoria própria (2024).

Esquema 2 - Tratamento dos frutos de *Sechium edule*

Fonte: Autoria própria (2024).

4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

4.3.1 Destilação dos solventes extratores

Antecedente ao procedimento de extração por maceração dos materiais vegetais devidamente fracionados, foi efetuado um processo de destilação fracionada dos solventes extratores, diclorometano e álcool etílico absoluto, com o intuito de purificá-los.

Para tal, seguiu-se o procedimento clássico de destilação fracionada descrito por Engel et al. (2011). O controle das condições do sistema de aquecimento foi realizado por intermédio da leitura constante da temperatura do termômetro acoplado à cabeça de destilação. Ressalta-se ainda que, para fins de segurança, todo o procedimento foi realizado em uma capela de exaustão.

4.3.2 Extração por maceração

Posteriormente ao procedimento de purificação dos solventes, a maceração dos materiais vegetais foi viabilizada, segundo o procedimento descrito por Simões et al. (2010). As frações vegetais, devidamente pesadas e subdivididas, foram submetidas a macerações com os solventes distintos: uma utilizando-se um solvente extrator pouco polar, o diclorometano, e o etanol como solvente de maior polaridade, conforme descrito nos tópicos anteriores. Nesse sentido, adicionou-se cada fração vegetal em Erlenmeyers de 500 mL, devidamente identificados com a parte da planta empregada (folha fresca ou seca, e fruto fresco ou seco) e o solvente extrator a ser utilizado. Preencheu-se o volume das vidrarias contento os materiais vegetais com cerca de 400 mL do solvente extrator para cada maceração realizada. Tampou-se os Erlenmeyers com suas respectivas tampas de teflon e deixou-se o sistema em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 7 dias, e sob o abrigo de luz.

Após o período de maceração, os extratos etanólicos e em diclorometano das folhas secas e frescas da espécie, assim como dos frutos, foram filtrados sob um sistema de filtração à vácuo, com funil sinterizado de porcelana e papel de filtro, sendo o líquido resultante armazenado em frascos do tipo âmbar, devidamente etiquetados, sob refrigeração.

4.3.3 Extração por Soxhlet

O procedimento clássico de extração por Soxhlet foi efetuado conforme as instruções da bibliografia escrita por Engel et al. (2011). Dessa forma, os materiais vegetais foram submetidos à duas extrações distintas: uma utilizando-se o álcool etílico absoluto como solvente extrator e outra, o diclorometano P.A. Ressalta-se que, como o procedimento de extração por Soxhlet envolve um processo de destilação adaptada, ambos os solventes para esta etapa não

necessitaram de ser destilados previamente, uma vez que as impurezas voláteis foram preliminarmente tratadas.

Assim, efetuou-se montagem em série do sistema de extração por Soxhlet (Figura 3), utilizando-se papel de filtro como material de envelope da fração vegetal. Todo procedimento foi realizado na capela de exaustão. O processo de extração das folhas secas e frescas de chuchu pelos solventes diclorometano e etanol foi realizado contabilizando-se ao todo sete ciclos, bem como os processos de extração dos frutos frescos do chuchu. Ao final, transferiu-se as misturas extratoras obtidas para frascos do tipo âmbar, devidamente identificados, armazenando-os na geladeira sob refrigeração.

4.3.4 Remoção dos solventes dos extratos

Após os procedimentos de extração das folhas e frutos do chuchu, a remoção dos respectivos solventes foi realizada empregando-se um aparelho de rotaevaporador. O processo de concentração dos extratos, portanto, foi efetuado baseando-se na literatura de Engel et al. (2011), onde inseriu-se o extrato a ser concentrado em um balão de rotavapor, acoplado à um banho maria à temperatura aproximada de 50°C, com rotação constante para homogeneização do aquecimento. Uma bomba de vácuo é associada ao aparelho a fim de promover uma destilação do solvente sob condições de vácuo, garantindo uma menor temperatura de ebulição do solvente a ser destilado e depositado no balão de destilação. Foi realizado ainda, um controle constante da temperatura do banho maria com o emprego de um termômetro.

A concentração do extrato foi controlada de maneira a deixar somente uma pequena fração deste no balão de rotaevaporador. Ressalta-se que, para cada concentração, foi realizada uma limpeza e ambiente das vidrarias com os respectivos solventes a serem destilados (diclorometano e etanol). Ao final do processo, com o auxílio de uma pipeta, fez-se a transferência quantitativa de cada extrato concentrado para frascos devidamente etiquetados e tarados, que permaneceram abertos em capela de exaustão para a evaporação dos solventes remanescentes. Pesou-se novamente a massa dos extratos, em balança analítica, e calculou-se os respectivos rendimentos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS

4.4.1 Caracterização por Cromatografia por Camada Delgada

4.4.1.1. Caracterização dos extratos dos frutos de *Sechium edule*

O emprego da técnica de Cromatografia por Camada Delgada (CCD) foi realizada afim de se obter um perfil qualitativo químico e preliminar das classes de metabólitos secundários dos extratos concentrados do fruto de chuchu. A metodologia empregada para tal procedimento foi baseada nas instruções descritas por Wagner e Bladt (2001). Nesse sentido, a fase estacionária utilizada foi composta por placas cromatográficas de Sílica gel 60 F₂₅₄, recortadas em dimensões de 10 x 10 cm e com marcação à lápis do ponto final de eluição. Anteriormente à aplicação em capilar dos extratos, verificou-se a existência de impurezas em cada uma das placas ao promover sua eluição prévia com metanol P.A e visualizá-las em um gabinete de raios Ultravioleta, com comprimentos de onda de 365 nm.

Para a aplicação dos extratos na placa, fez-se primeiramente uma solubilização completa do conteúdo destes, com o auxílio de uma pipeta automática. Para tal, os extratos em diclorometano foram solubilizados com este respectivo solvente extrator, enquanto os extratos etanólicos do fruto do chuchu foram diluídos em etanol P.A e uma pequena fração de água para garantir sua solubilização completa.

A aplicação destas respectivas amostras nas placas cromatográficas foi realizada com o auxílio de um tubo capilar, onde aplicou-se três amostras dos extratos na ordem de codificação explicitada na Tabela 3. Ressalta-se que, para cada aplicação de amostras diferentes, fez-se uma limpeza do tubo capilar com acetona P.A.

Tabela 3 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos dos frutos de *S. edule* na placa cromatográfica

Ordem de aplicação	Extrato	Codificação utilizada
1	Fruto seco em etanol por maceração	FRSEM
2	Fruto fresco em etanol por Soxhlet	FRFES
3	Fruto fresco em etanol por maceração	FRFEM
4	Fruto fresco em diclorometano por Soxhlet	FRFDS
5	Fruto fresco em diclorometano por maceração	FRFDM

Fonte: Autoria própria (2023).

Uma primeira eluição foi efetuada aplicando-se uma fase móvel composta por acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético glacial / água em proporções de (100:11:11:26), com revelação em borrifamento da solução de vanilina sulfúrica, seguida de um aquecimento da placa (WAGNER e BLADT, 2001). Posteriormente, realizou-se uma segunda eluição, em uma outra placa cromatográfica de mesma ordem de aplicação das amostras, empregando-se esta mesma fase móvel, mas com revelação em borrifamento do revelador de Produtos Naturais – Polietileno glicol, com visualização em espectrofotômetro de UV-Vis sob incidência de luz em comprimentos de onda de 365 nm. Ademais, para garantir uma melhor resolução de separação dos extratos em diclorometano dos frutos do chuchu, realizou-se uma terceira eluição dos extratos 4 e 5 em uma outra placa cromatográfica com fase móvel contendo diclorometano e metanol (95:5), e revelação em borrifamento da solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento (WAGNER e BLADT, 2001).

4.4.1.2. Caracterização dos extratos das folhas de *Sechium edule*

De maneira análoga à caracterização qualitativa e preliminar dos extratos dos frutos de *S. edule*, a aplicação da técnica de Cromatografia em Camada Delgada também foi efetuada nos extratos etanólicos e em diclorometano das folhas do chuchu, empregando-se a mesma metodologia básica de Wagner e Bladt (2001) descrita no tópico anterior. A solubilização, portanto, dos extratos em diclorometano das folhas de *Sechium edule* foi realizada com este respectivo solvente extrator, enquanto os extratos etanólicos do fruto do chuchu foram solubilizados em etanol P.A.

Foram efetuadas duas eluições distintas para a caracterização dos extratos das folhas: uma para os extratos em diclorometano, empregando-se como fase móvel uma solução de diclorometano – metanol (95:5), com revelação em borrifamento da solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento e visualização espectrofotômetro de UV-Vis sob incidência de luz em comprimentos de onda de 254 e 365 nm; e outra para os extratos etanólicos utilizando-se como fase móvel uma solução composta por acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água (100:11:11:26), com revelações em borrifamento de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento e do revelador de Produtos Naturais – Polietileno glicol (NP –PEG) e visualização em espectrofotômetro de UV-Vis sob incidência de luz em comprimentos de onda de 254 e 365 nm (WAGNER e BLADT, 2001). Ressalta-se que em ambas as análises foi empregada uma fase estacionária composta por placas cromatográficas de Sílica gel 60 F₂₅₄ (marca Merck Millipore), recortadas em dimensões de 10 x 10 cm.

Nesse sentido, para a eluição dos extratos em diclorometano das folhas de *S. edule*, a aplicação foi realizada com o auxílio de um tubo capilar, onde aplicou-se três bandas dos extratos na ordem de codificação explicitada na Tabela 4.

Tabela 4 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos em diclorometano das folhas de *S. edule* na placa cromatográfica

Ordem de aplicação	Extrato	Codificação utilizada
1	Folha fresca em diclorometano por Soxhlet	FFDS
2	Folha fresca em diclorometano por maceração	FFDM
3	Folha seca em diclorometano por Soxhlet	FSDS
4	Folha seca em diclorometano por maceração	FSDM

Fonte: Autoria própria (2023).

A aplicação dos extratos em etanol das folhas de chuchu nas placas cromatográficas, portanto, foi efetuada de maneira similar à aplicação dos extratos em diclorometano, empregando-se a seguinte ordem e codificação:

Tabela 5 - Codificação e ordem de aplicação dos extratos em diclorometano das folhas de *S. edule* na placa cromatográfica

Ordem de aplicação	Extrato	Codificação utilizada
1	Folha fresca em etanol por Soxhlet	FFES
2	Folha fresca em etanol por maceração	FFEM
3	Folha seca em etanol por Soxhlet	FSES
4	Folha seca em etanol por maceração	FSEM

Fonte: Autoria própria (2023).

4.4.2 Caracterização dos extratos em diclorometano por GC – MS

4.4.2.1 Preparo dos extratos brutos

Com o auxílio de uma espátula analítica, retirou-se uma pequena alíquota dos extratos brutos e secos, de forma a transferi-los para microtubos do tipo *safe lock* previamente identificados. Em seguida, as amostras foram solubilizadas em hexano grau HPLC, com auxílio de ultrassom (5 min) e vórtex (2 min). Posteriormente, os extratos foram filtrados com um

auxílio de uma pipeta de Pasteur e algodão, sendo transferidos para *vials* de polipropileno, os quais foram acondicionados na rack do amostrador automático para análise por GC - MS.

4.4.2.2 Instrumentação e condições de análise

O cromatógrafo gasoso utilizado para a caracterização dos extratos brutos em diclorometano de *Sechium edule* foi Agilent Technologies 7890A GC System acoplado ao Espectrômetro de Massas modelo Agilent Technologies 5975C inert MSD Triple-axis Detector e autosampler 7643. Utilizou-se uma coluna HP-5MS (5% phenyl methyl silox; 30 m x 250 μm x 0,25 μm). O gás de arraste utilizado foi o Hélio (1,4 mL/min). A temperatura do injetor foi ajustada para 150°C e a do detector para 250 °C. O modo de injeção utilizado foi o splitless, utilizando-se um método de programação de temperatura do forno de: 60 °C, com aumento gradual de 3 °C/min, 100 °C, 5 °C/min, 250 °C (5 min).

4.4.3 Caracterização dos extratos em etanol por HPLC-MS

4.4.3.1 Preparo dos extratos brutos

Com o auxílio de uma espátula analítica e balança analítica, foram pesados cerca de 5 mg dos extratos brutos secos em microtubos do tipo *safe lock* previamente identificados. Em seguida, as amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC, com auxílio de ultrassom (5 min) e vórtex (2 min), para se atingir a concentração final de 5 mg/mL. Com uma pipeta automática, foram pipetados 50 μL de cada uma das amostras para *vials* de polipropileno, os quais foram acondicionados na rack do amostrador automático para análise por UHPLC-MS/MS.

4.4.3.2 Instrumentação e condições de análise

As análises de UHPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema Nexera UHPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por electrospray e detecção do tipo quadrupolo/tempo de voo (ESI-Q-TOF) de alta resolução MaXis ETD (Bruker) e controlado pelo pacote de software Compass 1.5 (Bruker).

Alíquotas de 1 a 2 μL foram injetadas em uma coluna Shimpack XR-ODSIII (C18, 150 \times 2,0 mm, 2,2 μm) a 40°C sob uma taxa de fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. As fases móveis A e B (0,1% de ácido fórmico grau HPLC em água e acetonitrila grau HPLC, respectivamente) foram empregadas em uma eluição em modo gradiente a 5% B por 0.5 min, seguida de uma rampa

linear até 100% B em 20 min e uma espera a 100% B durante 4.5 min. Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização positivo a uma taxa espectral de 5,00 Hz. Os parâmetros da fonte de íons foram ajustados para 500 V de end plate offset, voltagem do capilar de 4.500 V, pressão do nebulizador de 3,0 Bar, e fluxo e temperatura do gás de secagem de 8,0 L/min e 200°C, respectivamente. Espectros de fragmentação foram adquiridos em modo dependente de dados (MS/MS automatizado) usando uma rampa de energia de colisão entre 15 e 60 eV. As configurações do resfriador de íons foram otimizadas para uma faixa de 100-1500 m/z usando uma solução calibrante de formato de sódio Sigma 1 mM em 2-propanol 50% J. T. Baker. A calibração de massas foi realizada por meio de infusão inicial de 20 µL de solução calibrante na fonte de íons e recalibração pós-aquisição dos dados brutos. A detecção do composto foi realizada por dissecação de pico cromatográfico com subsequente determinação da fórmula de acordo com a massa exata e o padrão isotópico (MS₁). A identificação putativa foi baseada na comparação dos espectros de fragmentação dos compostos (MS₂) com espectros de referência de substâncias padrão provenientes do banco de dados in house (substâncias de referência) e público MassBank (Horai et al., 2010), assim como no programa *Sirius Software 5.5.7*.

4.5 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS

De posse dos extratos brutos concentrados, a avaliação de suas bioatividades foi feita por intermédio de testes de bioensaios de plaqueamento para triagem *in vitro* de drogas anti – *Trypanosoma cruzi*. No caso do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto René Rachou, os extratos vegetais brutos são encaminhados para a Plataforma de Bioensaios para Triagem de Drogas anti *Trypanosoma Cruzi* (PlaBio Tc) do grupo de Genômica Funcional de Parasitos (GFP) da Fiocruz, que realiza tal triagem de drogas. Logo, as análises biológicas foram realizadas no dia 12 de março de 2024 no laboratório de bioensaios, cujos resultados foram encaminhados para o QPNB.

4.5.1 Ensaios biológicos para triagem *in vitro* de drogas anti – *Trypanosoma cruzi*

4.5.1.1 Manutenção de células para plaqueamento

Os experimentos foram realizados conforme protocolo descrito por Buckner et al. (1996) modificado. Culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo, em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol e suplementado com

SBF 10% e glutamina 2mM foram semeadas em garrafas de 25cm², 150.000 células, ou garrafas de 75cm², 450.000 células.

Incubou-se as culturas em estufa 37°C com 5% CO₂. Culturas em garrafas de 25cm² ou 75cm² foram infectadas após um período de aproximadamente 24 horas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen transformada para expressar o gene da β-galactosidase, 20 parasitas por célula. Os parasitas que não penetraram foram retirados por lavagem após 24h, e a cultura foi incubada em estufa 37°C e com 5% CO₂.

4.5.1.2 Plaqueamento das células, infecção e tratamento

Para o teste de atividade anti *T. cruzi*, uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células em 80 µl por poço de RPMI com vermelho fenol e suplementado, sendo a placa incubada “overnight” em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

As células, por outro lado, foram infectadas com 40.000 tripomastigotas por poço, diluídos em 20 µl de RPMI com vermelho fenol suplementado. Incubou-se a placa por 2 horas a 37°C e com 5% CO₂ e os parasitas que não penetraram foram retirados por substituição com 200 µl por poço de RPMI sem vermelho de fenol e suplementado.

A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas para o estabelecimento da infecção. Após 48 horas, o meio de cultura foi trocado por 180 de RPMI sem vermelho de fenol suplementado e 20 µl do extrato bruto a ser testado. Nesse sentido, os extratos brutos foram pré-diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), em uma concentração máxima de 10% na solução-estoque. Assim, os extratos foram testados em duplicata.

A adição das drogas à placa foi realizada da seguinte forma: 180 µl de RPMI suplementado e sem vermelho de fenol adicionados a cada poço; a seguir, 20 µl dos extratos brutos solubilizados foram adicionados a cada poço e sendo realizada a homogeneização com um agitador de placas. Desta forma, a concentração final dos compostos pós-diluição no meio foram de 1 ou 10 µg/ml.

Incubou-se a placa em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 96 horas. Após esse período, adicionou-se 50 µl por poço do substrato CPRG 500 µM com nonidet p40 0,5% e a leitura da placa foi realizada 16 a 20 horas após a adição do substrato, em leitor de ELISA com filtro de 570nm. Adicionalmente utilizou-se os seguintes controles em cada placa: culturas de células não infectadas por parasitas e sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita e tratadas com Benzonidazol a 1 µg/ml, culturas de células infectadas pelo parasita tratadas com DMSO 1%.

A análise foi realizada considerando a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo extrato testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasita na ausência deste extrato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DOS EXTRATOS

O processo de preparo dos extratos dos frutos e folhas da espécie *Sechium edule* deu-se de maneira a averiguar as possíveis diversidades de metabólitos extraídos por diferentes métodos de preparo e extração da amostra. Dessa forma, a tabela abaixo expressa as massas das frações vegetais antes e após o procedimento de secagem, bem como o teor de água perdido por cada uma destas.

Tabela 6 - Relação das massas das frações vegetais antes e após a secagem e relação com seu teor de água perdido

Fração vegetal	Massa (g) da amostra vegetal antes da secagem	Massa (g) da fração amostra após a secagem	Teor (%) de água perdida
Folhas	42,15	12,92	69,35
Frutos	56,94	3,27	88,99

Fonte: Autoria própria (2023).

Logo, baseando-se nos dados supracitados na Tabela 6, tornou-se possível verificar o grande conteúdo de água presente na espécie do chuchu, sobretudo em seus frutos, onde quase 90% de seu conteúdo é referente à água, fato este que exemplifica, portanto, sua composição química nutricional de água ilustrada pela Tabela 2 do tópico 3.3. Além disso, a grande percentagem de massa perdida nos frutos de *Sechium edule* após a secagem justificou a escolha da preparação de somente um extrato no fruto seco, que se deu por pelo processo de maceração utilizando o etanol como solvente extrator.

Os extratos produzidos pelos diferentes solventes são apresentados na Fotografia 1, onde é possível visualizar a diferença dos aspectos visuais dos extratos etanólicos e em diclorometano de folhas de *S. edule*. Nesta comparação, portanto, fica nítida a diferença da concentração de clorofila em ambos, na qual a intensidade da coloração verde no extrato etanólico (ensaio da esquerda) marca a melhor eficiência de extração da clorofila pelo solvente etanol. É importante ressaltar também que esta diferença foi visível em todos os outros extratos das folhas e frutos de *Sechium edule*, tanto nas frações que sofreram um processo de secagem quanto nas que permaneceram frescas.

O tipo de solvente extrator é um componente importante a ser avaliado para os procedimentos de extração. Quanto aos solventes utilizados para o preparo dos respectivos

extratos deste trabalho, o diclorometano trata-se de um solvente de característica pouco polar, na qual espera-se extrair produtos naturais de menor polaridade e ligeiramente voláteis, como os metabólitos da classe dos terpenos e alguns ácidos graxos presentes na composição da espécie *Sechium edule*, por exemplo. Já o etanol, por outro lado, por se tratar de um solvente razoavelmente polar, tende a extrair metabólitos e substâncias de polaridade semelhante, onde esperam-se extrair não somente metabólitos da classe dos flavonoides, por exemplo, mas também outros componentes de pigmentos, como a clorofila presente nas folhas da espécie do chuchu, e produtos de seu metabolismo primário, tais como os carboidratos e alguns aminoácidos presentes nos frutos de *S. edule* (LEITE, 2009).

Fotografia 1 - Aspecto visual do extrato etanólico de folhas frescas de *S. edule* X Aspecto visual do extrato em diclorometano de folhas frescas de *S. edule*



Fonte: A autoria própria (2023).

Quanto ao procedimento de remoção dos solventes extratores, foi utilizado o equipamento rotaevaporador, cujo mecanismo de funcionamento é explicado no tópico 3.2.3. No entanto, é importante ressaltar o cuidado realizado durante o controle de temperatura do sistema de banho-maria. Isto pois, por se tratar de um sistema de destilação à vácuo empregando-se o banho-maria como fonte de calor, o controle minucioso da temperatura, por meio da utilização de um termômetro, foi essencial para evitar perdas de produtos naturais de caráter volátil e termo instáveis, de forma a não comprometer a composição dos extratos preparados.

Por fim, com relação ao rendimento dos extratos concentrados obtidos após o procedimento de remoção dos solventes extratores, a Tabela 7 esquematiza os nomes dos extratos e sua codificação, as massas iniciais da fração vegetal submetida à cada preparo distinto

de extração, bem como as massas finais dos extratos concentrados obtidos após a remoção dos solventes.

Tabela 7 - Tabela comparativa de rendimentos dos extratos de *Sechium edule* preparados por diferentes técnicas

N° do extrato	Tipo do extrato	Codificação	Massa inicial da fração vegetal (g)	Massa final do extrato concentrado (mg)	Rendimento (%)
1	Folha fresca em etanol por Soxhlet	FFES	10,43	297,52	2,85
2	Folha fresca em etanol por maceração	FFEM	10,50	297,88	2,84
3	Folha seca em etanol por Soxhlet	FSES	3,26	316,78	9,72
4	Folha seca em etanol por maceração	FSEM	3,27	201,31	6,16
5	Folha fresca em diclorometano por Soxhlet	FFDS	9,98	65,20	0,65
6	Folha fresca em diclorometano por maceração	FFDM	10,48	71,58	0,68
7	Folha seca em diclorometano por Soxhlet	FSDS	3,26	54,38	1,67
8	Folha seca em diclorometano por maceração	FSDM	3,13	75,58	2,41
9	Fruto seco em etanol por maceração	FRSEM	3,27	1220,73	37,33
10	Fruto fresco em etanol por Soxhlet	FRFES	14,98	473,15	3,16
11	Fruto fresco em etanol por maceração	FRFEM	14,42	351,64	2,44
12	Fruto fresco em diclorometano por Soxhlet	FRFDS	13,69	2,71	0,02
13	Fruto fresco em diclorometano por maceração	FRFDM	14,44	9,81	0,06

Fonte: Autoria própria (2023).

À vista dos rendimentos dos extratos de *S. edule* expressos pela Tabela 7, tornou-se possível realizar algumas inferências a respeito dos dados supracitados. Em primeiro plano, com relação aos extratos das folhas de chuchu, foi possível notar um maior rendimento nas folhas secas, tanto para os extratos em diclorometano quanto para os etanólicos. Este resultado é esperado pois, como mencionado anteriormente, o processo de secagem proporciona a remoção da água do material vegetal, bem como a concentração preliminar dos produtos naturais deste, o que corrobora posteriormente para uma melhor eficiência e facilidade no processo de difusão dos metabólitos para o solvente extrator. Com relação ao tipo de solvente utilizado, percebeu-se um menor rendimento nos extratos em diclorometano das folhas de *S. edule* do que nos extratos etanólicos. Este também é um resultado esperado, visto que bibliograficamente são listados uma maior percentagem de compostos fenólicos e produtos do metabolismo primário de caráter polar na composição do chuchu do que de ácidos de caráter pouco polar e componentes voláteis nas folhas do chuchu (VIEIRA *et. al*, 2018). Por fim, a respeito da técnica de extração, notou-se um rendimento similar nos extratos etanólicos pelo método de Soxhlet e por maceração, e um rendimento ligeiramente maior no preparo por maceração dos extratos em diclorometano do que no preparo por Soxhlet. Este último resultado pode ser justificado devido ao fato de que, por se tratar de uma técnica de extração à quente, a utilização do método de Soxhlet pode ter proporcionado uma ligeira perda dos componentes voláteis e termolábeis de caráter pouco polar extraídos pelo diclorometano.

Por outro lado, com relação aos extratos dos frutos de *Sechium edule*, primeiramente é possível notar uma nítida diferença dos rendimentos nos extratos de fruto seco e frescos, visto que há um rendimento muito maior no extrato preparado pelo fruto seco. A justificativa para este fato deve-se às mesmas ponderações realizadas para os extratos das folhas do chuchu: já que o processo de secagem promove a pré-concentração dos metabólitos, facilitando seu posterior processo de difusão para o solvente extrator. Além disso, observou-se um rendimento muito baixo para os extratos em diclorometano com relação aos extratos etanólicos. Espera-se este resultado também, uma vez que, segundo Iñiguez *et al.* (2008), os frutos do chuchu são compostos principalmente por água e carboidratos, substâncias estas de caráter polar que dificilmente são extraídas pelo diclorometano. Por fim, também verificou-se um mesmo padrão comparativo dos rendimentos entre os métodos de extração por maceração e por Soxhlet nos extratos etanólicos e em diclorometano, que também podem ser justificados pelas considerações realizadas nos extratos das folhas de *S. edule*.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NOS EXTRATOS

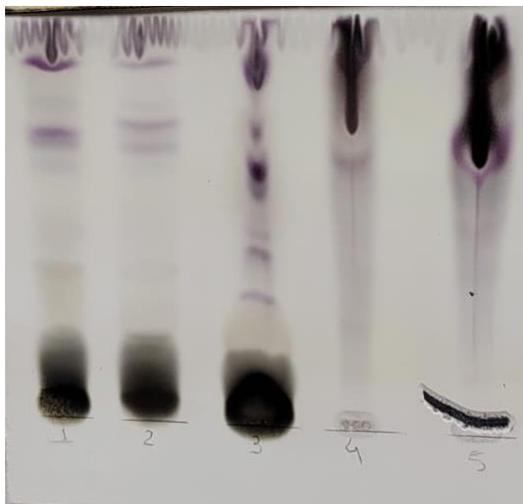
5.2.1 Caracterização por Cromatografia por Camada Delgada

5.2.1.1 Caracterização dos extratos dos frutos de *Sechium edule*

Para a caracterização dos extratos dos frutos de *Sechium edule*, uma solubilização total de seus componentes foi necessária para garantir a representatividade completa dos metabólitos aplicados nas placas. Nesta perspectiva, a solubilização de cada extrato foi efetuada empregando-se os respectivos solventes extratores utilizados durante o procedimento de extração de cada droga vegetal. Durante o procedimento, no entanto, observou-se uma dificuldade de solubilização de alguns componentes presentes nos extratos etanólicos dos frutos da espécie. O aspecto de cristalizado destas substâncias levou a suposição de que possivelmente estes compostos eram referentes aos açúcares constituintes do fruto do chuchu. Logo, ao adicionar-se uma pequena quantidade de água nestas respectivas amostras, viabilizou-se a solubilização completa destes, possibilitando a aplicação posterior de tais extratos na placa cromatográfica.

Nesse sentido, a primeira eluição destes extratos foi referente a uma fase móvel de caráter ligeiramente polar, com composição de acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético glacial – água, em proporções de (100:11:11:26). A disputa das afinidades químicas dos componentes da amostra entre a fase estacionária de sílica gel (de caráter bastante polar) com a respectiva fase móvel permitiu a realização de inferências sobre as polaridades dos metabólitos secundários identificados pelo revelador universal de vanilina sulfúrica. Não somente isto, os aspectos de coloração das bandas reveladas na placa após o aquecimento desta também viabilizou conclusões sobre os possíveis grupos de metabólitos eluídos. A Fotografia 2 ilustra os aspectos das bandas reveladas após o procedimento.

Fotografia 2 - CCD dos extratos em etanol e diclorometano dos frutos *S. edule* eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de vanilina sulfúrica



Fonte: Autoria própria (2023).

- ¹ Extrato do fruto seco de *S. edule* obtido por maceração em etanol
- ² Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol
- ³ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por maceração em etanol
- ⁴ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano
- ⁵ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

Ao analisar-se a Fotografia 2 fica evidente que a polaridade de tal fase móvel não foi capaz de gerar uma boa separação dos constituintes presentes nas amostras 4 e 5, referentes aos extratos em diclorometano. Isto pois, não houve a visualização de praticamente nenhuma banda nestas amostras, somente borrões ao final da eluição, que dizem respeito o fato da fase móvel ter sido muito mais polar do que os componentes do extrato. Este resultado, já era esperado para os extratos em diclorometano, já que se espera a extração de compostos muito pouco polares.

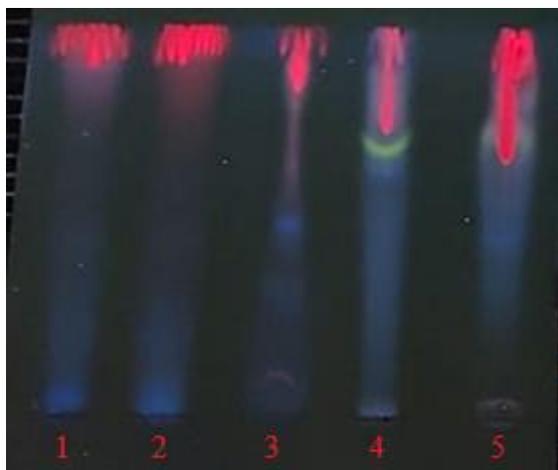
Por outro lado, nos extratos etanólicos, visualizou-se bandas de coloração violeta. Segundo Wagner e Bladt (2001), esta coloração é típica de compostos terpenóides e/ou fenilpropanóides, indicando que provavelmente nos extratos etanólicos foram extraídos terpenóides hidroxilados ligeiramente polares ou fenilpropanóides polares. Além disso, percebeu-se uma similaridade das bandas reveladas nos três extratos em etanol (referentes as aplicações das amostras 1, 2 e 3), cujas manchas apresentaram aproximadamente os mesmos

fatores de retenção (0,20; 0,44; 0,66; 0,71 e 0,88). Este comportamento é esperado, uma vez que os extratos etanólicos, em geral, tendem a extrair aproximadamente os mesmos compostos, diferindo-se apenas pelas suas respectivas concentrações nos diferentes métodos de extração, com exceção dos compostos termolábeis que são pouco extraídos pelo método de Soxhlet.

Ademais, os diferentes fatores de retenção dos componentes eluídos possibilitaram realizar inferências sobre as polaridades destas substâncias, de forma que àquelas que permaneceram mais retidas na fase estacionária e, portanto, mais próximas do local de aplicação, são de caráter mais polar do que àquelas substâncias que foram bastante eluídas pela fase móvel. Ainda, observou-se uma retenção de determinados compostos no local de aplicação da placa, dos quais permaneceram-se muito retidos pela sílica, indicando que provavelmente referem-se aos açúcares de polaridade mais acentuada presentes no fruto.

Seguidamente, a revelação da segunda placa cromatográfica, também eluída nesta mesma fase móvel, possibilitou mais inferências sobre os metabólitos extraídos nos extratos do fruto do chuchu. De acordo com Wagner e Bladt (2001), o revelador denominado como Produtos Naturais – Polietileno glicol tem por objetivo a identificação seletiva de compostos fenólicos, como flavonoides, cumarinas e entre outros. Dessa forma, ao se analisar a Fotografia 3, evidenciada abaixo, percebeu-se a inexistência destes compostos nos extratos etanólicos, mas verificou-se, a seguir, a presença de um tipo de composto fenólico, de coloração esverdeada com R_f de aproximadamente 0,68, nos dois extratos em diclorometano. Em geral, realmente não é esperado uma grande variedade deste tipo de metabólito nos frutos do chuchu, já que mais de cinquenta por cento de sua composição é referente aos seus metabólitos primários e nutrientes (IÑIGUEZ *et al.*, 2008). Ainda, é possível verificar também a presença de bandas de coloração vermelha fluorescente no topo da eluição dos extratos, referentes à clorofila, que segundo Paloshi e colaboradores (1998), apresenta uma fluorescência típica avermelhada na visualização em comprimento de onda de 365 nm.

Fotografia 3 - CCD dos extratos em etanol e diclorometano dos frutos *S. edule* eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de Produtos Naturais – Polietileno glicol

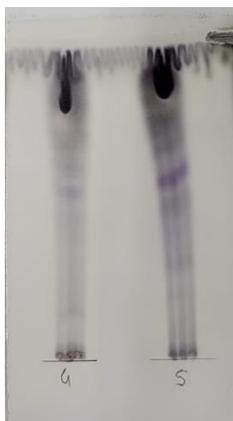


Fonte: Autoria própria (2023).

- ¹ Extrato do fruto seco de *S. edule* obtido por maceração em etanol
- ² Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol
- ³ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por maceração em etanol
- ⁴ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano
- ⁵ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

Com o intuito de promover uma melhor separação dos componentes presentes nos extratos em diclorometano, do qual a fase móvel não foi tão eficiente para promover sua separação gradativa na sílica gel, um eluente de caráter menos polar foi empregado. Logo, conforme evidenciado na Fotografia 4, a eluição em diclorometano e metanol (95:5) foi a ideal para a promoção da separação dos metabólitos extraídos nestes extratos. Assim como os extratos etanólicos, observou-se a presença de bandas de coloração violeta avermelhada, que segundo Wagner e Bladt (2001), provavelmente são referentes aos terpenóides pouco polares extraídos pelo diclorometano. Analogamente, também é possível inferir que os componentes de menor fator de retenção (0,12 e 0,25), que foram mais retidos pela sílica, possuem uma maior polaridade do que os componentes de maior *R_f* (0,52; 0,60; 0,72 e 0,75). Outrossim, também foi possível perceber uma similaridade dos aspectos das bandas dos extratos em diclorometano do fruto de *S. edule*, uma vez que tais bandas apresentaram aproximadamente os mesmos fatores de retenção.

Fotografia 4 - CCD dos extratos em diclorometano dos frutos *S. edule* eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e revelados com solução de vanilina sulfúrica



Fonte: Autoria própria (2023).

⁴ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano

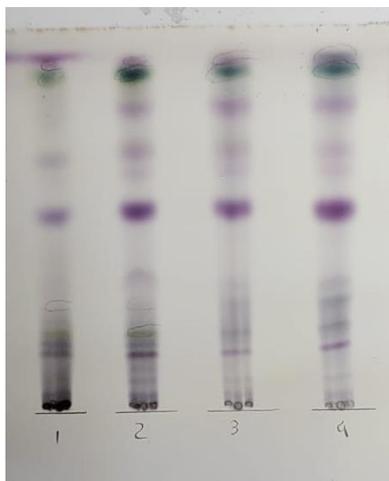
⁵ Extrato do fruto fresco de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

5.2.1.2 Caracterização dos extratos das folhas de *Sechium edule*

A caracterização dos extratos das folhas de *Sechium edule* foi realizada com o mesmo objetivo de obter um perfil químico qualitativo prévio dos metabólitos extraídos pelas técnicas de maceração e Soxhlet. De maneira análoga à caracterização dos frutos, foi efetuada uma solubilização total de tais extratos com o intuito de garantir a representatividade completa dos metabólitos aplicados nas placas.

Nesse sentido, em primeiro plano, foi feita uma eluição dos extratos em diclorometano, aplicando-se uma fase móvel composta por uma solução de diclorometano – metanol (95:5), de caráter menos polar, a qual foi adequada para garantir uma boa separação dos metabólitos de menor polaridade que teoricamente foram extraídos pelo diclorometano. Assim, a disputa de afinidades químicas dos componentes da amostra entre a fase estacionária (de caráter polar) com a respectiva fase móvel viabilizou a inferência sobre tais aspectos da polaridade dos metabólitos visualizados pela Fotografia 5. Ainda, a revelação da placa utilizando-se o revelador universal de vanilina sulfúrica garantiu também a avaliação mais geral do perfil de tais metabólitos, de maneira com que os aspectos de coloração das bandas reveladas na placa, após o aquecimento desta, também viabilizou conclusões sobre os possíveis grupos de metabólitos eluídos.

Fotografia 5 - CCD dos extratos em diclorometano das folhas *S. edule* eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e revelados com solução de vanilina sulfúrica



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano

² Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

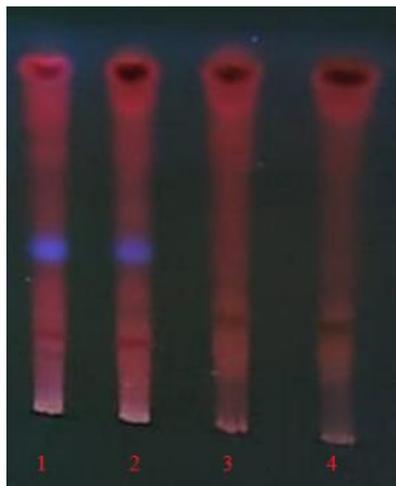
³ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano

⁴ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

Tendo em vista o resultado ilustrado na Fotografia 5, tornou-se possível perceber um perfil cromatográfico bastante semelhante nas bandas eluídas dos 4 extratos em diclorometano. Foram visualizadas em ambas as amostras, portanto, bandas de coloração violeta, que segundo Wagner e Bladt (2001) são típicas de compostos terpenóides e/ou fenilpropanóides, com fatores de retenção aproximados de (0,05; 0,08; 0,16; 0,20; 0,23; 0,36; 0,58; 0,70; 0,75 e 0,90). Neste sentido é esperado um perfil de compostos terpenóides para os extratos em diclorometano, uma vez que, em geral, os terpenóides referem-se à uma classe de metabólitos de caráter menos polar, os quais são facilmente extraídos pelo solvente diclorometano, cuja menor polaridade garante uma maior afinidade química com este grupo de compostos. Espera-se, no entanto, uma diferença na concentração destes metabólitos entre os extratos preparados por maceração e por Soxhlet, visto que esta última, por ser considerada uma técnica exaustiva, tende a concentrar mais os metabólitos do que a maceração (com exceção aos metabólitos termolábeis). Ainda, são visualizadas bandas de coloração esverdeada em ambos os extratos, com fatores de retenção próximos de 0,98, dos quais são referentes à clorofila. Isto pôde ser inferido devido ao fato de que, na visualização da placa cromatográfica em comprimento de onda de 365 nm, estas bandas

apresentaram uma coloração vermelha, que segundo Paloshi e colaboradores (1998), são típicas da clorofila. A Fotografia 6, portanto, ilustra a visualização da placa sobre luz UV com comprimento de onda de 365nm.

Fotografia 6 - CCD dos extratos em diclorometano das folhas *S. edule* eluídos com solução de diclorometano e metanol (95:5) e visualização em luz UV 365 nm



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano

² Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

³ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em diclorometano

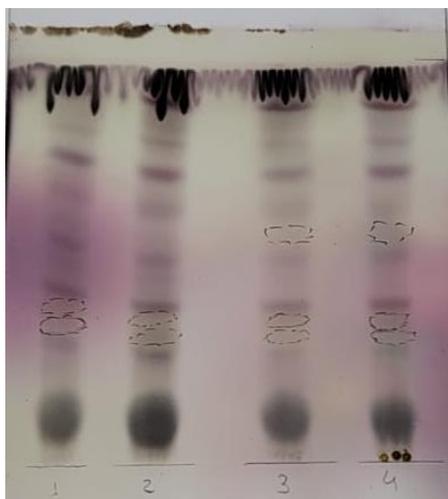
⁴ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por maceração em diclorometano

Além da clorofila, a visualização da placa cromatográfica dos extratos em diclorometano na luz UV em comprimento de onda de 365 nm também permitiu a verificação de duas bandas de coloração azul, com *Rf* próximo de 0,46, nos extratos 1 e 2, referentes às amostras de folhas frescas. Como são manchas escuras, não é possível ter um indício de qual classe de metabólitos elas se referem. No entanto, pode-se concluir uma diferença de extração entre os perfis das folhas frescas e secas, visto que estes compostos somente foram detectados nas amostras de folhas frescas.

Para os extratos etanólicos, foi efetuada uma eluição empregando-se a fase móvel composta por uma solução de acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético – água (100:11:11:26). Considerada uma fase de caráter mais polar, este eluente foi polar o suficiente

para garantir uma boa separação dos metabólitos extraídos pelo etanol, que teoricamente, esperam-se ser também de caráter mais polar. Assim, a aplicação do revelador de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento permitiu, portanto, a revelação de um perfil mais geral dos metabólitos eluídos, conforme ilustra a Fotografia 7.

Fotografia 7 - CCD dos extratos em etanol das folhas *S. edule* eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de vanilina sulfúrica



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

² Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

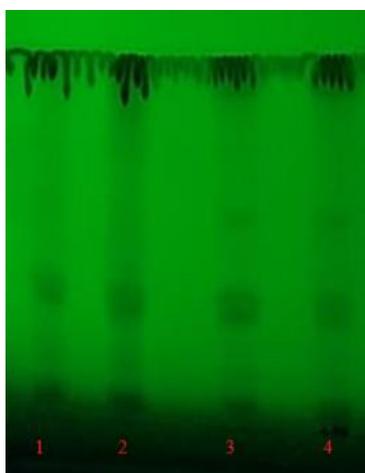
³ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

⁴ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

A visualização de bandas de coloração violeta foi nítida em todas as amostras, de forma a apresentarem um perfil de fatores de retenção muito semelhantes nas quatro aplicações (0,13; 0,27; 0,40; 0,51; 0,76; 0,81 e 0,86). A coloração violeta, no entanto, diferentemente das visualizadas nos extratos em diclorometano, muito provavelmente são referentes aos fenilpropanóides e/ou terpenóides hidroxilados de caráter ligeiramente polar. Isto pois, utilizando-se o etanol como solvente extrator, é esperada a extração de metabólitos de afinidades químicas mais semelhantes ao etanol, ou seja, metabólitos de caráter mais polar. Além disso, infere-se também que as bandas de menor fator de retenção apresentam uma polaridade maior do que as bandas visualizadas com maior *R_f*.

Quanto a visualização sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, foi possível verificar a existência de duas bandas escuras de *R_f* próximos de 0,32 e 0,37 em todos os extratos etanólicos, bem como uma banda escura de fator de retenção aproximado de 0,57 nos extratos das folhas secas. Esta evidência, ilustrada pela Fotografia 8, indica, portanto, uma diferença no perfil de extração das folhas frescas e secas, visto que esta mancha evidenciada no extrato das folhas secas não foi observada no extrato das folhas frescas.

Fotografia 8 - CCD dos extratos em etanol das folhas *S. edule* eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e visualização em luz UV 254 nm



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

² Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

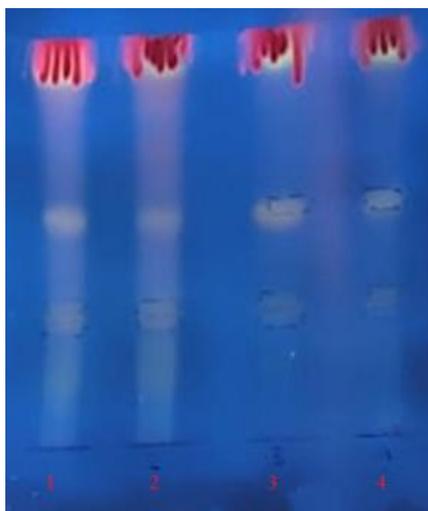
³ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

⁴ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

Posteriormente, uma eluição com revelação utilizando-se o solvente Produto Natural – Polietileno glicol teve por objetivo a identificação seletiva de compostos fenólicos, como flavonoides, cumarinas e entre outros. Em geral, é esperado a presença deste tipo metabólito nos extratos etanólicos das folhas de *S. edule*, visto que há uma similaridade entre as polaridades destes compostos e, portanto, uma afinidade química entre estes para o processo de difusão durante extração, além da citação na literatura da presença de compostos polifenólicos nas folhas do chuchu. Assim, ao analisar-se a Fotografia 9, referente à visualização em luz UV em comprimento de onda de 365 nm, tornou-se possível perceber a existência duas manchas amareladas com fatores de retenção próximos de 0,32 e 0,64 em todas as amostras aplicadas.

No entanto, apesar da detecção destas manchas, não é possível realizar nenhuma inferência precisa a respeito de qual classe de metabólitos específicos elas se referem. Outrossim, fica evidente também a presença a clorofila extraída pelas amostras, marcadas por bandas de coloração avermelhada com Rf próximo de 0,98.

Fotografia 9 - CCD dos extratos em etanol das folhas *S. edule* eluídos com solução de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26) e revelados com solução de Produtos Naturais – Polietileno glicol



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

² Extrato da folha fresca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

³ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por extração por Soxhlet em etanol

⁴ Extrato da folha seca de *S. edule* obtido por maceração em etanol

5.2.2 Caracterização dos extratos em diclorometano das folhas e frutos de *Sechium edule* por GC – MS

Embora os extratos brutos em diclorometano das folhas e frutos da espécie *Sechium edule* tenham sido submetidos à cromatografia gasosa, o processamento dos dados cromatográficos foram inviabilizados devido à incapacidade de acesso ao laboratório de cromatografia do CEFET-MG em detrimento do período de reforma deste.

5.2.3 Caracterização dos extratos em etanol das folhas e frutos de *Sechium edule* por HPLC-MS

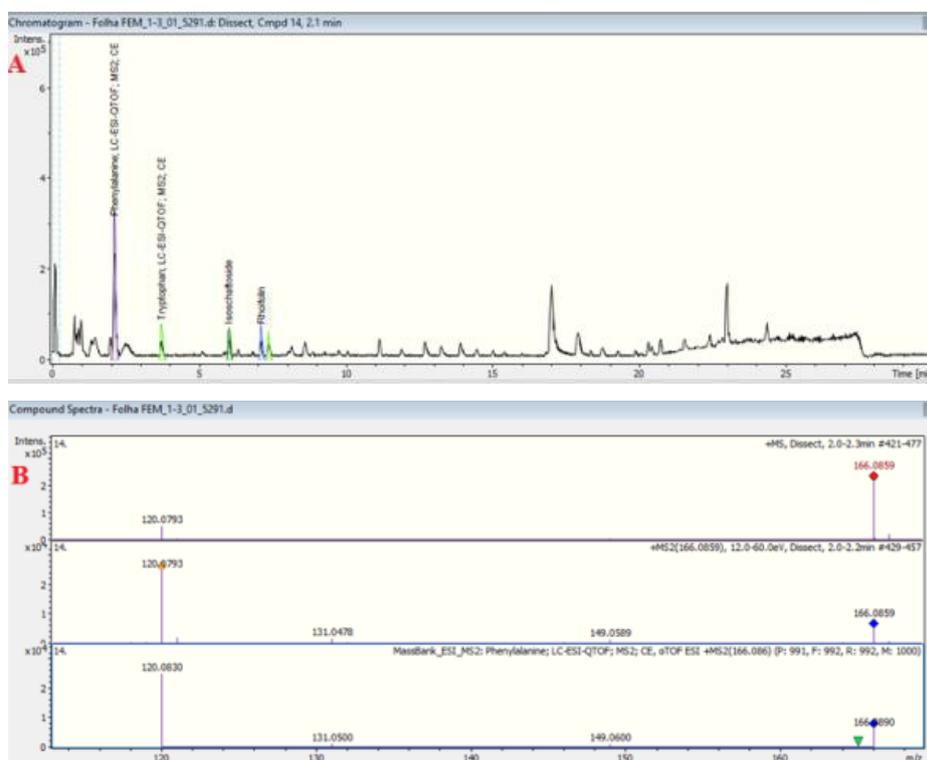
A avaliação do perfil químico e cromatográfico dos extratos etanólicos de *Sechium edule* deu-se por intermédio do processamento dos cromatogramas obtidos na análise em UHPLC-ESI-MS/MS pelo Software *DataAnalysis* (Bruker), de forma como que a detecção da substância foi realizada por dissecção de pico cromatográfico com subsequente determinação de sua fórmula de acordo com a massa exata e o padrão isotópico (MS_1) obtidos no processamento dos dados espectrais. A posteriori, a identificação putativa das respectivas substâncias, ou seja, a inferência das substâncias, foi baseada na comparação dos espectros de fragmentação dos compostos (MS_2) com espectros de referência de substâncias padrão provenientes do banco de dados *in house* de referência e público *MassBank* (Horai et al., 2010), assim como no programa *Sirius Software 5.5.7*. Ademais, também foi efetuada uma comparação dos compostos anotados com o referencial bibliográfico para a espécie, no intuito de verificar a compatibilidade das substâncias encontradas com àquelas já listadas na literatura para *Sechium edule*.

O processo de análise dos dados obtidos para cada amostra, portanto, foi feito por intermédio da dissecção dos picos cromatográficos de maior intensidade nos cromatogramas dos extratos, considerando-se o referencial do branco analítico de metanol, de maneira considerar também somente as substâncias referentes aos produtos do metabolismo vegetal, de acordo com a fórmula de seus os íons precursores (MS_1) e espectros de fragmentação (MS_2). Isto pois, dentre as centenas de substâncias encontradas nos extratos durante o processamento dos dados dos cromatogramas e espectros de massas, pôde-se verificar que algumas delas referiam-se à alguns produtos não derivados no metabolismo celular das plantas, como pesticidas, agrotóxicos, antibióticos e entre outros produtos de origem sintética. Ainda, devido à incompatibilidade ou carência de padrões de referência no banco de dados do Software *DataAnalysis*, alguns compostos com pico cromatográfico de grande intensidade nas amostras não puderam ser anotados, dos quais somente foram anotados suas massas exatas e padrão monoisotópicos, fragmentos dos íons percussores, bem como a possível fórmula molecular sugerida pelo programa.

A título de exemplificação do processo de análise dos produtos encontrados para os extratos etanólicos de *Sechium edule*, a anotação da substância fenilalanina do extrato em etanol da folha fresca por maceração (FFEM) ocorreu da seguinte forma: em primeiro plano, no cromatograma da amostra, evidenciado na Figura 8, selecionou-se o pico cromatográfico de grande intensidade referente ao tempo de retenção de 2,1 minutos. Posteriormente, determinou-

se sua fórmula molecular de acordo com sua massa exata e seu padrão isotópico (MS_1) (m/z 166,0859) fornecido pelo processamento dos dados espectrais de seu íon percussor (também evidenciados na Figura 8). Em seguida, a identificação putativa da fenilalanina foi baseada na comparação do espectro de fragmentação do seu íon percussor (MS_2), considerando-se os três fragmentos de maior abundância relativa (m/z 120,0793 - 100%; m/z 166,0859 - 20%; m/z 121,0825 - 8%), com os espectros de referência de substâncias padrão provenientes do banco de dados público *MassBank*.

Figura 8 - (A) Cromatograma obtido para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*, (B) espectro de massas do íon do pico cromatográfico em t_r igual a 2,1 min, seu espectro de fragmentação e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*



Fonte: Autoria própria (2024).

Nesta perspectiva, o processamento dos dados para os extratos etanólicos de frutos e folhas do chuchu corroborou para a anotação das substâncias listadas na Tabela 8, evidenciada a seguir. Nesta, são anotadas a nomenclatura dos compostos encontrados e sua massa monoisotópica, tempo de retenção (t_r /min) referente, massa exata e padrão monoisotópico ($MS_1/[M+H]^+$ (m/z)), fragmentos dos íons percussores e sua abundância relativa ($MS_2/ m/z$, abundância relativa- %), íon molecular ($[M+H]^+$), fórmula molecular, bem como o referencial

literário já citado para o respectivo composto na espécie de *S.edule*. A seguir da Tabela 8, estão apresentadas também as fórmulas estruturais das substâncias anotadas, evidenciadas pelas Figuras 9 e 10. Os cromatogramas das amostras e espectros de massas das substâncias identificadas, por sua vez, foram inseridos nas figuras em anexo.

Tabela 8 - Substâncias anotadas por UHPLC-ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de *Sechium edule*

Extrato	Substância anotada (massa monoisotópica)	tr (min)	MS Scan [M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS/MS (m/z, abundância relativa- %)	Íon Molecular [M+H] ⁺	Fórmula Molecular	Referência
Folha Fresca em Etanol por Maceração (FFEM)	Fenilalanina ^{a,b} (165.0790)	2.1	166.0859	120.0793 (1.00); 166.0859 (0.20); 121.0825 (0.08)	C ₉ H ₁₂ NO ₂	C ₉ H ₁₁ NO ₂	VÁSQUEZ, 2008 CORONEL <i>et al.</i> 2017
	Triptofano ^{a,b} (204.0899)	3.7	205.0968	188.0703 (1.00); 146.0588 (0.31); 143.0717 (0.14)	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	CERIO <i>et al.</i> 2019
	Isoschaftosídeo ou Apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo ^{a,b} (564.1479)	6.0	565.1525	565.1520 (1.00); 566.1554 (0.33); 379.0798 (0.33)	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₄	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Roifolina ou Apigenina 7-O-ramnoglicosídeo ^{a,b} (578.1635)	7.1	579.1678	271.0595 (1.00); 579.1675 (0.21); 433.1108 (0.19)	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo ^{a,b} (608.1741)	7.4	609.1783	301.0699 (1.00); 609.1779 (0.21); 463.1211 (0.20)	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
Folha Fresca em Etanol por Soxhlet (FFES)	Tirosina ^{a,b} (181.0738)	1.4	182.0811	136.0747 (1.00); 165.0542 (0.70); 123.0431 (0.25)	C ₉ H ₁₂ NO ₃	C ₉ H ₁₁ NO ₃	CORONEL <i>et al.</i> 2017
	Fenilalanina ^{a,b} (165.0790)	2.2	166.0857	120.0795 (1.00); 166.0858 (0.18); 121.0828 (0.07)	C ₉ H ₁₂ NO ₂	C ₉ H ₁₁ NO ₂	VÁSQUEZ, 2008 CORONEL <i>et al.</i> 2017
	Isoschaftosídeo ou Apigenina-6-	6.0	565.1528	565.1554 (1.00); 409.0898 (0.32); 379.0797 (0.31)	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₄	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021

	arabinosídeo-8-glicosídeo ^{a,b} (564.1479)							CERIO <i>et al.</i> 2019
	Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo ^{a,b} (608.1741)	7.4	609.1783	301.0715 (1.00); 302.0730 (0.18)	609.1779 (0.21);	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Não anotada	20.7	593.2705	593.2704 (1.00); 533.2499 (0.16)	594.2736 (0.34);	C ₃₂ H ₄₂ NaO ₉	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	-
	Não anotada	23.0	621.3017	621.3013 (1.00); 561.2804 (0.23)	622.3043 (0.41);	C ₃₄ H ₄₆ NaO ₉	C ₃₄ H ₄₆ O ₉	-
	Fenilalanina ^{a,b} (165.0790)	2.1	166.0859	120.0794 (1.00); 121.0829 (0.09)	166.0860 (0.20);	C ₉ H ₁₂ NO ₂	C ₉ H ₁₁ NO ₂	VÁSQUEZ, 2008 CORONEL <i>et al.</i> 2017
	Luteolina 7-O-glucosídeo ^{a,b} (448.1006)	6.8	449.1073	287.0550 (1.00); 288.0584 (0.09)	449.1070 (0.18);	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
Folha Seca em Etanol por Maceração (FSEM)	Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo ^{a,b} (608.1741)	7.4	609.1797	301.0704 (1.00); 463.1222 (0.18)	609.1792 (0.22);	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Kaempferol ^{a,b} (286.0477)	8.8	287.0549	287.0550 (1.00); 153.0174 (0.12)	288.0583 (0.16);	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Crisoeriol ^{a,b} (300.0634)	10.1	301.0706	301.0705 (1.00); 286.0470 (0.50)	258.0521 (0.52);	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	CERIO <i>et al.</i> 2019
	Não anotada	21.6	535.2673	535.2673 (1.00); 536.2704 (0.42)	282.2783 (0.47);	C ₃₂ H ₃₉ O ₇	C ₃₂ H ₃₈ O ₇	-

	Não anotada	22.4	637.2986	637.2985 (1.00); 638.3017 (0.41)	559.2671 (0.47);	$C_{36}H_{45}O_{10}$	$C_{36}H_{44}O_{10}$	-
	Não anotada	23.0	621.3035	621.3033 (1.00); 561.2823 (0.22)	622.3065 (0.42);	$C_{36}H_{45}O_9$ $C_{34}H_{46}NaO_9$	$C_{36}H_{44}O_9$ $C_{34}H_{46}O_9$	-
Folha Seca em Etanol por Soxhlet (FSES)	Fenilalanina ^{a,b} (165.0790)	2.2	166.0859	120.0792 (1.00); 121.0827 (0.08)	166.0860 (0.20);	$C_9H_{12}NO_2$	$C_9H_{11}NO_2$	VÁSQUEZ, 2008 CORONEL <i>et al.</i> 2017
	Luteolina 7-O-glucoside ^{a,b} (448.1006)	6.8	449.1074	287.0553 (1.00); 288.0587 (0.16)	449.1073 (0.18);	$C_{21}H_{21}O_{11}$	$C_{21}H_{20}O_{11}$	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
	Crisoeriol ^{a,b} (300.0634)	10.1	301.0708	301.0707 (1.00); 258.0525 (0.51)	286.0474 (0.51);	$C_{16}H_{13}O_6$	$C_{16}H_{12}O_6$	CERIO <i>et al.</i> 2019
	Não anotada	20.8	593.2740	593.2739 (1.00); 533.2529 (0.16)	594.2771 (0.37);	$C_{34}H_{40}O_9$	$C_{34}H_{39}O_9$	-
	Não anotada	21.6	535.2690	535.2686 (1.00); 447.2166 (0.11)	536.2720 (0.37);	$C_{32}H_{39}O_7$	$C_{32}H_{38}O_7$	-
	Não anotada	21.8	657.4530	657.4528 (1.00); 659.4586 (0.09)	658.4563 (0.41);	$C_{43}H_{61}O_5$ $C_{34}H_{66}NaO_{10}$	$C_{43}H_{60}O_5$ $C_{34}H_{66}O_{10}$	-
	Não anotada	23.0	621.3047	621.3047 (1.00); 561.2838 (0.24)	622.3078 (0.41);	$C_{36}H_{45}O_9$ $C_{34}H_{46}NaO_9$	$C_{36}H_{44}O_9$ $C_{34}H_{46}O_9$	-
Fruto Fresco em Etanol por Maceração (FRFEM)	Não anotada ^c (1)	0.9	325.1129	145.0487 (1.00); 127.0377 (0.39)	163.0598 (0.48);	$C_{12}H_{21}O_{10}$	$C_{12}H_{20}O_{10}$	-
	Não anotada ^c (2)	1.4	439.1781	231.0841 (1.00); 232.0877 (0.08)	228.0757 (0.08);	$C_{16}H_{32}NaO_{12}$	$C_{16}H_{32}O_{12}$	-

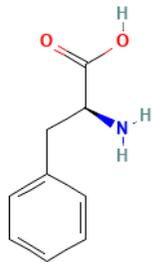
	Não anotada ^c (3)	2.0	210.0763	164.0703 (1.00); 146.0593 (0.51); 210.0764 (0.17)	C ₁₀ H ₁₂ NO ₄	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	-
	Fenilalanina ^{a,b} (165.0790)	2.1	166.0860	120.0793 (1.00); 166.0861 (0.22); 146.0590 (0.11)	C ₉ H ₁₂ NO ₂	C ₉ H ₁₁ NO ₂	VÁSQUEZ, 2008 CORONEL <i>et al.</i> 2017
Fruto Fresco em Etanol por Soxhlet (FRFES)	Não anotada ^c (1)	0.9	325.1131	145.0488 (1.00); 163.0598 (0.50); 127.0380 (0.43)	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	-
	Não anotada (4)	1.2	174.0761	174.0760 (1.00); 128.0696 (0.96); 175.0793 (0.09)	C ₇ H ₁₂ NO ₄	C ₇ H ₁₁ NO ₄	-
	Não anotada ^c (5)	2.2	372.1286	354.1179 (1.00); 355.1212 (0.19); 164.0702 (0.19)	C ₁₆ H ₂₂ NO ₉	C ₁₆ H ₂₁ NO ₉	-
	Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo ^{a,b} (608.1741)	7.4	609.1797	301.0705 (1.00); 609.1795 (0.25); 463.1224 (0.20)	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	VIEIRA <i>et al.</i> 2018 ANZHEN <i>et al.</i> 2021 CERIO <i>et al.</i> 2019
Fruto Seco em Etanol por Maceração (FRSEM)	Não anotada ^c (6)	0.8	266.1237	248.1132 (1.00); 266.1238 (0.39); 266.1603 (0.15)	C ₁₀ H ₂₀ NO ₇	C ₁₀ H ₁₉ NO ₇	-
	Não anotada ^c (1)	0.9	325.1130	154.0488 (1.00); 163.0597 (0.49); 127.0378 (0.35)	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	-
	Não anotada	1.5	231.0840	231.0843 (1.00); 232.0879 (0.12); 205.0554 (0.02)	C ₈ H ₁₆ NO ₆	C ₈ H ₁₆ O ₆	-

^a Anotação putativa baseada na fórmula (*SmartFormula*) dos íons precursores (MS_1) e espectros de fragmentação (MS_2) e comparação com espectros de referência do banco de dados MassBank usando o Software *DataAnalysis* (Bruker).

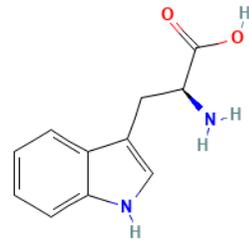
^b Confirmação dos compostos químicos baseados em uma pesquisa bibliográfica na literatura para a espécie *Sechium edule*.

^c Anotação putativa baseada na deconvolução espectral dos íons precursores e íons produto (MS_1 e MS_2) empregando a ferramenta *Sirius Software 5.5.7*.

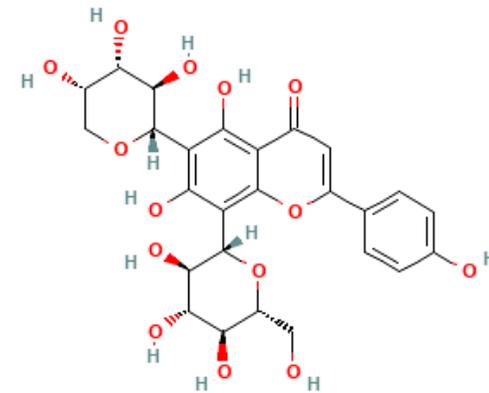
Figura 9 – Estruturas químicas das substâncias anotadas por UHPLC ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de *Sechium edule*



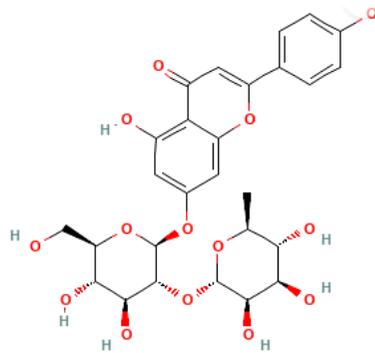
(Fenilalanina)



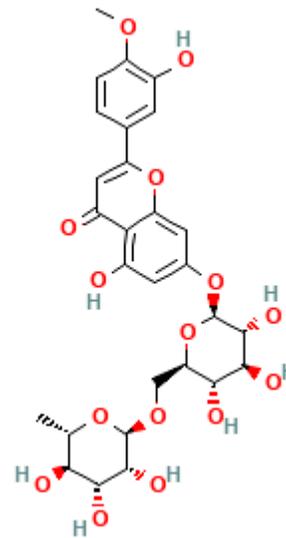
(Triptofano)



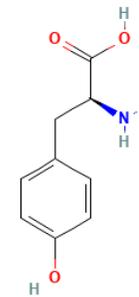
(Isoschaftosídeo ou Apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo)



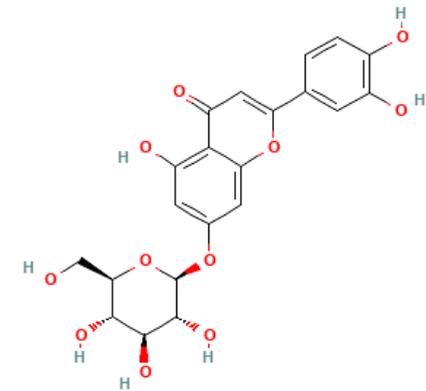
(Roifolina ou Apigenina 7-O-ramnoglicosídeo)



(Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo)



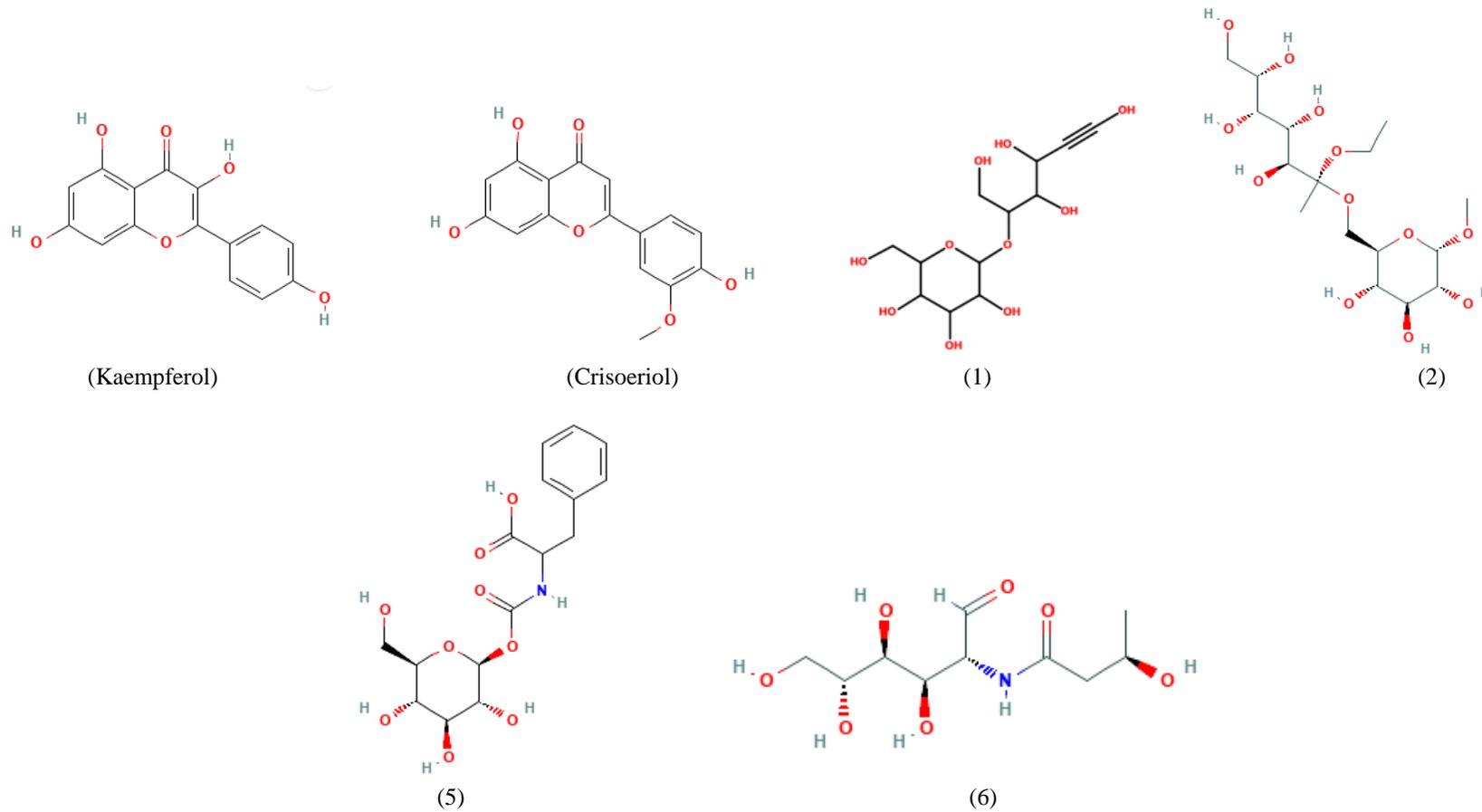
(Tirosina)



(Luteolina 7-O-glucosídeo)

Fonte: PubChem (2024)

Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias anotadas por UHPLC ESI-MS/MS nos extratos etanólicos dos frutos e folhas de *Sechium edule*



Fonte: PubChem (2024)

De acordo com os dados supracitados na Tabela 8, para os extratos etanólicos das folhas de *Sechium edule*, foram anotados a classes de metabólitos flavonóides, bem como alguns aminoácidos. De fato, são esperados uma capacidade de extração destas classes de compostos pelo etanol, uma vez que suas polaridades relativamente altas corroboram para uma maior afinidade química com tal solvente extrator, possibilitando a facilidade do processo de difusão destas substâncias no interior da célula vegetal. Desta forma, os aminoácidos anotados para os extratos das folhas do chuchu foram: fenilalanina (VÁSQUEZ, 2008; CORONEL *et al.* 2017), triptofano (CERIO *et al.* 2019) e tirosina (CORONEL *et al.* 2017). Os flavonoides e flavonas anotadas, por sua vez, foram: isoschaftosídeo ou apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo, roifolina ou apigenina 7-O-ramnoglicosídeo, diosmina ou diosmetina 7-O-rutiosídeo, luteolina 7-O-glucosídeo (VIEIRA *et al.* 2018; ANZHEN *et al.* 2021; CERIO *et al.* 2019), kaempferol (ANZHEN *et al.* 2021; CERIO *et al.* 2019) e crisoeriol (CERIO *et al.* 2019).

Por outra perspectiva, para os extratos etanólicos dos frutos de *S. edule*, em geral, somente foram anotados açúcares, aminoácidos e ácidos graxos glicosilados. Este padrão de extração de metabólitos para os frutos do chuchu já era esperado, uma vez que, segundo Iñiguez *et al.* (2008), a composição química e nutricional de frutos maduros da espécie é referente à principalmente metabólitos primários, como carboidratos, proteínas, ácidos graxos e entre outros. Apesar de não ser esperada a presença abundante de flavonoides ou outros compostos do metabolismo secundário nos frutos de *Sechium edule*, para o extrato etanólico do fruto fresco por Soxhlet (FRFES), foi anotado o flavonóide diosmina ou diosmetina 7-O-rutiosídeo (VIEIRA *et al.* 2018; ANZHEN *et al.* 2021; CERIO *et al.* 2019), também encontrado nas folhas da espécie.

Com o intuito de estabelecer um padrão comparativo entre a capacidade de extração de metabólitos dos diferentes métodos extrativos aplicados para as folhas e frutos do chuchu, criou-se o Quadro 1, que auxilia a visualização comparativa da anotação das substâncias determinadas nas amostras pelos seus respectivos métodos de extração.

Quadro 1 – Substâncias anotadas nos diferentes métodos de extração aplicados para as amostras de *Sechium edule* e suas respectivas classes e massas de íons percussores

Classe	Substância	MS Scan [M+H] ⁺ (m/z)	Extrato						
			Folhas				Frutos		
			Frescas		Secas		Fresco		Seco
			Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet	Maceração	Soxhlet	Maceração
Aminoácidos	Fenilalanina	166.0859	+	+	+	+	+	-	-
	Triptofano	205.0968	+	-	-	-	-	-	-
	Tirosina	182.0811	-	+	-	-	-	-	-
	Desconhecida	372.1286	-	-	-	-	-	+	-
Flavonóides	Isoschaftosídeo ou Apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo	565.1525	+	+	-	-	-	-	-
	Roifolina ou Apigenina 7-O-ramnoglicosídeo	579.1678	+	-	-	-	-	-	-
	Diosmina ou Diosmetina 7-O-rutiosídeo	609.1783	+	+	+	-	-	+	-
	Luteolina 7-O-glucosídeo	449.1073	-	-	+	+	-	-	-
	Kaempferol	287.0549	-	-	+	-	-	-	-
	Crisoeriol	301.0706	-	-	+	+	-	-	-
	Não anotada	266.1237	-	-	-	-	-	-	+
	Não anotada	325.1129	-	-	-	-	-	+	-
	Não anotada	439.1781	-	-	-	-	+	-	-
	Não anotada	593.2705	-	+	-	+	-	-	-

Não anotada	621.3017	-	+	+	+	-	-	-
Não anotada	535.2673	-	-	+	+	-	-	-
Não anotada	637.2986	-	-	+	-	-	-	-
Não anotada	657.4530	-	-	-	+	-	-	-
Não anotada	210.0763	-	-	-	-	+	-	-
Não anotada	174.0761	-	-	-	-	-	+	-
Não anotada	231.0840	-	-	-	-	-	-	+

Fonte: Autoria própria (2024).

Diante da visualização dos dados expostos no quadro supracitado, tornou-se possível perceber que, em geral, o padrão de extração dos diferentes métodos extrativos para o extrato em etanol de *Sechium edule* foi bem semelhante para as folhas da espécie, uma vez que observou-se a extração tanto de flavonoides quanto de aminoácidos em todas as amostras deste material vegetal. No entanto, pode-se perceber que, dentro os padrões de extração observados para as folhas do chuchu, o processo de extração em etanol das folhas secas por maceração (FSEM) foi o que apresentou maior eficiência extrativa, já que refere-se ao método que conduziu a presença de maior variedade de metabólitos identificados, sobretudo, em maior número de flavonoides. Tal fato observado já era esperado, uma vez que, segundo Leite (2009), a secagem do material vegetal durante o preparo do extrato corrobora para concentração preliminar dos metabólitos, bem como para o retardamento da degradação destes, pois com a baixa atividade de água, evita-se um crescimento microbiano, reações enzimáticas e hidrólise de tais produtos, proporcionando uma melhor eficiência do processo de difusão destes para o solvente extrator. Além disso, pelo fato da técnica de maceração consistir-se em um procedimento realizado à temperatura ambiente, diferentemente da extração por Soxhlet que é realizada à quente, evita-se a perda de metabólitos termolábeis, garantindo-se a extração de produtos naturais tanto voláteis e não voláteis, quanto termoestáveis e termoinstáveis (TOMASI, 2021).

Em contrapartida, para os frutos do chuchu, também foi visualizado uma semelhança no perfil de extração dos diferentes métodos aplicados, já que, em geral, verificou-se a presença de açúcares em todos os extratos, conforme esperado pelo referencial bibliográfico citado por Iñiguez et al. (2008). No entanto, considerando-se a identificação de flavonoides, pôde-se notar que somente o extrato etanólico do fruto fresco por Soxhlet (FRFES) foi capaz de extrair um tipo de flavonóide: a diosmina ou diosmetina 7-O-rutiosídeo, também encontrada em extratos da folha de *S. edule*. Nesta perspectiva, é possível inferir que, em termos de extração de flavonoides, este respectivo método extrativo apresentou uma melhor eficiência extrativa. Tal resultado, portanto, pode ser explicado devido ao fato de que a técnica de Soxhlet, por conduzir uma extração exaustiva da matéria orgânica vegetal, da qual há a aplicação de grande número de ciclos de extração, corrobora para extrair totalmente ou quase a totalidade dos metabólitos termoestáveis (JENSEN, 2007).

Ademais, com relação ao perfil de extração dos flavonoides anotados na análise em UHPLC-ESI-MS/MS dos extratos etanólicos de *S. edule*, é possível, de certa forma, correlacionar o uso popular medicinal do chuchu com a presença de tais metabólitos. Conforme

citado por Vásquez (2008) e Vieira et al. (2018), a espécie é usualmente conhecida por apresentar propriedades diuréticas, cardioprotetora, antioxidante, gastro e hepatoprotetoras, além de apresentar atividades contra diabetes/hipoglicemia. Pode-se dizer, portanto, que estas características estão estritamente relacionadas à presença dos flavonoides anotados no estudo em questão. O isoschafotsídeo (ou apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo), por exemplo, exibe características antioxidantes que ajudam a neutralizar os radicais livres, prevenindo o dano celular e o estresse oxidativo (SOWA et al., 2023). Esta flavona também apresenta atividades anti-inflamatórias, atuando na modulação de citocinas inflamatórias e inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (GUAN et al., 2022). Além disso, conforme citado por Su et al. (2022), o isoschaftosídeo apresenta também propriedades hepatoprotetoras, no qual é capaz de reduzir drasticamente a deposição lipídica nas células do tecido humano.

No caso da roifolina (ou apigenina 7-O-ramnoglicosídeo), é relatado na literatura sua atividade anti-inflamatória, anti-diabética, hepatoprotetora, cardio protetora e antioxidativa (ZENGIN et al., 2023). Outrossim, um estudo feito por ZHENG et al. (2022), apontou para o potencial efeito anticâncer desta flavona contra células tumorais do pâncreas. Para a diosmina, estudos indicam sua atividade gastroprotetora. A pesquisa feita por Arab et al. (2015) relata a capacidade de proteção de tal flavonoide contra lesões gástricas induzidas. Estudos feitos para a luteolina indicam que, seu metabólito ativo ou derivados, como a luteolina 7-O-glucosídeo, apresentam características antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica, antidiabética, cardioprotetoras e neuroprotetoras (HUANG, 2023). Imran et al. (2019), além de citar as propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes cardio e neuroprotetoras para o kaempferol, indica também uma potencial atividade inibitória de crescimento de células tumorais, sobretudo nos tecidos da pele, fígado e cólon. Por fim, com relação ao crisoeriol, Aboulaghras et al. (2022) também cita características antibacterianas, anti-inflamatória, antifúngica, anti-osteoporose e neuroprotetoras.

Com relação à atividade anti-*Trypanosoma cruzi* somente é relatado por Uchiyama (2009) e Izumi et al. (2011) o potencial efeito inibitório das flavonas apigenina e luteolina contra o crescimento de células do protozoário *Trypanosoma cruzi*. De fato, conforme evidenciado na Tabela 8, houve a anotação de tais produtos nos extratos etanólicos das folhas de *Sechium edule*, porém, na forma glicosilada em suas estruturas moleculares (apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo, apigenina 7-O-ramnoglicosídeo, luteolina 7-O-glucosídeo). A presença de tais glicosídeos, portanto, podem ou não alterar a atividade destes fitofármacos contra o patógeno em questão, assim como sua contração nos extratos brutos pode ou não ser

suficiente para relatar uma atividade satisfatória nos ensaios biológicos. Dessa forma, tendo como base estes resultados supracitados, evidencia-se a necessidade da realização de uma triagem *in vitro* de drogas anti *T. cruzi* para a averiguação da possível atividade dos extratos etanólicos da espécie contra o respectivo patógeno.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Sechium edule*

5.4.1 Ensaios biológicos para triagem *in vitro* de drogas anti – *Trypanosoma cruzi*

Com o intuito de averiguar a possível atividade anti – *Trypanosoma cruzi* dos diferentes tipos de extratos de *Sechium edule*, foi efetuado um ensaio de triagem inicial *in vitro* nos extratos brutos e secos preparados. O respectivo ensaio, portanto, foi realizado pela Plataforma de Bioensaios para Triagem de Drogas anti *Trypanosoma Cruzi* (PlaBio Tc) do grupo de Genômica Funcional de Parasitos (GFP) da Fiocruz. Os resultados encontrados para as amostras foram evidenciados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados encontrados para a triagem *in vitro* de drogas anti – *Trypanosoma cruzi* dos extratos brutos de *Sechium edule*

Tipo do extrato	Codificação	Leitura	Leitura	Média	DP	CV	BZ	Solvente	CP	Resultado	Resultado
		1	2							1 (%)	2 (%)
Fruto fresco em etanol por maceração	FRFEM	3,1	3,2	3,2	0,1	2,2	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	0,0
Fruto fresco em etanol por Soxhlet	FRFES	3,1	3,2	3,2	0,1	1,3	1,3	DMSO 1%	3,1	1,6	0,0
Fruto seco em etanol por maceração	FRSEM	3,1	3,2	3,2	0,1	1,9	1,3	DMSO 1%	3,1	0,1	0,0
Folha fresca em etanol por maceração	FFEM	3,2	3,3	3,2	0,1	1,5	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	0,0
Folha fresca em etanol por Soxhlet	FFES	3,1	3,4	3,3	0,2	6,4	1,3	DMSO 1%	3,1	1,4	0,0
Folha seca em etanol por maceração	FSEM	3,2	3,4	3,3	0,1	3,9	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	0,0
Folha seca em etanol por Soxhlet	FSES	3,2	3,3	3,2	0,1	0,9	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	0,0
Folha fresca em diclorometano por maceração	FFDM	3,4	3,5	3,5	0,1	0,3	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	0,0
Folha seca em diclorometano por Soxhlet	FFDS	3,2	3,1	3,2	0,1	1,3	1,3	DMSO 1%	3,1	0,0	1,7
Folha seca em diclorometano por maceração	FSDM	3,0	3,3	3,2	0,2	6,8	1,3	DMSO 1%	3,1	4,6	0,0
Folha seca em diclorometano por Soxhlet	FSDS	3,0	3,1	3,1	0,1	1,2	1,3	DMSO 1%	3,1	3,8	1,7

Fonte: PlaBio Tc da Fiocruz (2024).

De acordo com a Plataforma de Bioensaios, são considerados ativos contra o *Trypanosoma cruzi* aqueles extratos que apresentarem capacidade de inibição do protozoário de, no mínimo, 50% nos dois resultados. Nesta perspectiva, baseando-se nos dados da Tabela 9, infere-se que nenhuma das amostras testadas apresentou resultado satisfatório para a inibição do parasito. Os extratos em diclorometano dos frutos, no entanto, não foram testados na triagem *in vitro* devido ao seu baixo rendimento, cuja massa foi totalmente utilizada para os ensaios cromatográficos. Ademais, devido aos resultados negativos de atividade das amostras, os ensaios subsequentes de IC₅₀ e citotoxicidade das potenciais drogas não foram efetuados.

Apesar de um resultado insatisfatório na triagem *in vitro* de drogas anti-*Trypanosoma cruzi* dos extratos de *Sechium edule*, os ensaios cromatográficos efetuados em UHPLC-ESI-MS/MS dos extratos etanólicos do chuchu identificaram a presença de duas flavonas com atividade anti-*Trypanosoma cruzi* já relatada na literatura: a apigenina (UCHIYAMA, 2009) e luteolina (IZUMI et al. 2011). A presença dessas flavonas, portanto, poderiam corroborar para uma possível atividade da espécie contra o parasito. No entanto, tal atividade negativa possivelmente está atrelada a alguns fatores das amostras. O primeiro deles é o fato de que, por terem sido somente testados os extratos brutos da espécie, a sua complexa matriz, que contém centenas de substâncias, proporciona um alto grau de diluição destas flavonas, cuja baixa concentração talvez não teria sido suficiente para demonstrar uma capacidade de inibição satisfatória do protozoário. Um outro possível motivo para este resultado, também associado à circunstância de terem sido somente avaliados os extratos brutos, se dá pela possível presença de outras substâncias que, em conjunto e na interação com tais fitofármacos, poderiam causar a inibição da atividade destes. Além disso, a identificação destas flavonas em sua forma glicosilada nos extratos etanólicos também diz respeito à uma outra possível justificativa para a atividade insatisfatória destes contra o *T. cruzi*. Isto pois, a presença de diferentes glicosídeos na estrutura da respectiva flavona pode promover uma alteração de sua potencial atividade farmacológica, de maneira a modificar seu sítio de interação com os receptores das células do patógeno. Dessa forma, uma possível solução para a verificação da real atividade ou não das amostras de *Sechium edule*, seria promover o fracionamento de tais extratos, de forma testar biologicamente somente as frações enriquecidas de tais flavonas.

6 CONCLUSÕES

Em função dos resultados observados e discutidos neste trabalho para o preparo, caracterização química e avaliação da bioatividade de extratos de frutos e folhas de *Sechium edule* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, tornou-se possível realizar as seguintes inferências sobre o estudo efetuado. Em primeiro plano, a preparação dos extratos foi realizada de maneira a promover um diferente perfil de extração de metabólitos da planta, ao considerar-se os seguintes fatores essenciais durante sua elaboração: o material da droga vegetal (folhas ou frutos), seu estado inicial (folhas/frutos frescos ou secos), o tipo de método de extração empregado (maceração ou Soxhlet) e o tipo de solvente extrator utilizado (etanol ou diclorometano).

Dentre os metabólitos presentes no chuchu, foi possível anotar para as amostras dos extratos etanólicos das folhas os aminoácidos fenilalanina, triptofano e tirosina, e os flavonoides e flavonas isoschaftosídeo ou apigenina-6-arabinosídeo-8-glicosídeo, roifolina ou apigenina 7-O-ramnoglicosídeo, diosmina ou diosmetina 7-O-rutiosídeo, luteolina 7-O-glucosídeo, kaempferol e crisoeriol. Nos extratos em etanol dos frutos de *S. edule*, foram identificados, de modo geral, açúcares, aminoácidos e ácidos graxos glicosilados. O flavonóide diosmina ou diosmetina 7-O-rutiosídeo foi encontrado também para o extrato etanólico do fruto fresco por Soxhlet (FRFES).

Verificou-se também um padrão de extração bem semelhante para os diferentes tipos de extratos etanólicos das folhas da espécie. No entanto, pode-se perceber que a forma que conduziu a maior eficiência de extração, por apresentar uma maior variedade de flavonoides promissores foi o processo de extração em etanol das folhas secas por maceração (FSEM). Para os frutos dos extratos etanólicos do chuchu, o método de extração que conduziu à maior eficiência de extração de flavonoides foi o extrato etanólico do fruto fresco por Soxhlet (FRFES).

As propriedades medicinais do chuchu, conhecidas popularmente como diuréticas, cardioprotetora, antioxidante, gastro e hepatoprotetoras, e anti - diabeles/hipoglicemia puderam ser correlacionadas com a presença dos respectivos flavonoides identificados, dos quais estudos anteriores comprovaram tais propriedades supracitadas para estes produtos naturais. Com relação a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, de fato foram encontradas as flavonas apigenina e luteolina, citados por Uchiyama (2009) e Izumi et al. (2011) por apresentarem uma atividade satisfatória contra células do protozoário *T. cruzi*. No entanto, no presente trabalho, foram

identificados somente as formas glicosiladas destes produtos, que puderam ou não alterar sua potencial atividade.

Os ensaios biológicos *in vitro* para triagem de drogas anti – *Trypanosoma cruzi* apresentaram um resultado insatisfatório para todos os extratos brutos analisados. Contudo, em detrimento da identificação das flavonas glicosiladas apigenina e luteolina, citados na literatura por apresentarem um potencial de inibição de crescimento das células, tem-se como perspectivas futuras a realização do fracionamento dos extratos etanólicos das folhas da espécie, de forma a testar biologicamente somente as frações enriquecidas de tais flavonas, eliminando os possíveis fatores de interferência proporcionados pela matriz complexa dos extratos brutos e averiguando-se de forma mais específica sua real atividade contra o patógeno. Tem-se como expectativa a realização deste procedimento em extratos etanólicos das folhas secas preparados por maceração (FSEM), uma vez que foi este respectivo método que apresentou uma melhor eficiência extrativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULAGHRAS, S., et al. Health Benefits and Pharmacological Aspects of Chrysoeriol. **Pharmaceuticals**. V. 15. N° 973. [S.I], 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais**. Brasil 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterpicos-e-plantas-medicinai.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2023.

ANZHEN, F. et al. **Combined genomic, transcriptomic, and metabolomic analyses provide insights into chayote (*Sechium edule*) evolution and fruit development**. Horticulture Research. [S.I]. 2021.

ARAB, H. H., et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PLoS One**. V. 10. N° 3. [S.I], 2015.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L. M. J.; FLAMME, A. C. L.; VOORHIS, W. C. V. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing b-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. V. 40. n. 11. Washington, 1996.

CERIO et al. New insight into phenolic composition of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). **Food Chemistry**. v. 295, n°1. [S.I] 2019

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, Campinas, 456 p, 2006.

CORONEL, O. A. D. A.; et al. Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swarts). **Fruit and Vegetable Phytochemicals and Human Health**. v. 2, n° 1. [S.I] 2017

CORRÊA, M. **Promoção e intervenção sobre aspectos da (hiper)medicalização em usuários de uma Unidade Básica de Saúde**. 2016. Monografia (Curso de Especialização Multiprofissional na Atenção Básica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Março de 2016.

COSTA, K. A. Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator soxhlet visando emprego em pavimentos. **Revista Matéria**. V. 22, n° 02. Rio de Janeiro, 2016.

COSTA, M.; TAVARES, V. R; AQUINO M.V.M.; MOREIRA, D. B. Doença de Chagas: uma revisão bibliográfica. **REFACER - Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**. v. 2, n° 1. Goiás, 2018.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 546 p, 2009.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**. V. 32, No. 9, 2444-2457. São Paulo, 2009.

ECOSOSTENIBLILE, um mondo dentro i codici dela natura. ***Sechium edule***. Itália, 2022. Disponível em: <https://antropocene.it/en/2022/12/10/sechium-edule-2/>. Acesso em: 06 de jun. 2024.

ENGEL, R.G.; KRIZ, G. S.; LAMPAN, G. M.; PAVIA, D. L. **Indrotuction to organic laboratory techniques: a small scale approach**. 3 ed. Canada: Cengage Learning, 1024 p, 2011.

FERNANDES, K. N. **Avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos manipulados em Belo Horizonte (MG): Análise Orgânica e Inorgânica**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares pela Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 2020.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JUNIOR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

GUAN, S., et al. Isoschaftoside Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Microglia through Regulation of HIF-1 α Mediated Metabolic Reprogrammin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 22. N $^{\circ}$ 1. China, 2022.

HAVLICEK V.; SPIZEK J. **Natural products analysis: instrumentation, methods and applications**. Hoboken. New Jersey: Wiley, 624 p, 2014.

HORAI, H., et al. **Massbank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences**. J Mass Spectrom. 2010;45(7):703–14. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.

HUANG, L., et al. Immunopharmacological Activities of Luteolin in Chronic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 24. N $^{\circ}$ 2136. Republico of Korea, 2023.

IMRAN, M., et al. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. **Molecules**. V. 24. N $^{\circ}$ 2277. [S.l], 2019.

IÑIGUEZ, Jorge Cadena et al. Production, Genetics, Postharvest Management and Pharmacological Characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. **Global Science Books**, v. 1, n $^{\circ}$ 1, México, 2008.

IZUMI, E.; et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **The Royal Society of Chemistry**. V. 28, n $^{\circ}$ 1, 809–823, Japan (2011)

JESSEN, W., B. The origin of the Soxhlet extractor. **Chemistry education Today**. V 84, n $^{\circ}$ 12. Toronto - Canada, 2007.

KOVÁTS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. **Helvetica Chimica**. Vol. 41. No. 7, 1915-1932, 1958.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Editora Atheneu, São Paulo, 344 p, 2009.

LIANG, J.; GUO, X.,D.; HAN, F. UHPLC-ESI-MS/MS Quantitative Analyses of Multicomponent Hu Gan Tablets. **Molecules**. V. 24. N $^{\circ}$ 4241. [S.l], 2019.

MOREIRA, T.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas mediciniais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 30, n $^{\circ}$ 3, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, L. S.; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. S.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Plantas Mediciniais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – **Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos**. Inter Science Place. V. 4, n $^{\circ}$ 17, 54-74, 2011.

PALOSCHI, R. G.; ZENI, M.; RIVEROS, R. Experimentos cromatográficos. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 35-41, 1998.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, No. 4, 146-152, [s.l], 2012.

PERES, Lázaro E. P. Metabolismo secundário. **Metabolismo secundário**. São Paulo, 2004.

RESEARCH, G. **Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi***. Pesquisa e Inovação em ciências farmacêuticas. Paraná, 2021. Disponível em: 1. https://www.researchgate.net/figure/Figura-151-Ciclo-do-Trypanosoma-cruzi_fig15_350444826. Acesso em: 02 de set. de 2024.

RUSSELL J. M. **Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination**. 2 and edition. Boca Raton. CRC Press, 624 p, 2008.

SANTOS, E.; FALÇÃO, L. M. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. *Portuguese Journal of Cardiology*. V. 39. No. 5, 279-289. Portugal, 2020.

SCARAVELLI, F. S.. **Fitoterapia / Fernanda Savioli Scaravelli**. – Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 196 p, 2018.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semiárido de Pernambuco: uma inovação no controle de fitopatógenos**. Dissertação (Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco). Pernambuco, 2013.

SINGI, G., DAMESCENO, D.D., D'ANDRÉA, E.D., SILVA, G.A. Efeitos agudos dos extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum* L.) e do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 15. N. 2, 94-97, 2005.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1096 p, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Cengage Learning. 9 Ed. São Paulo, 2015.

SOWA, I. et al. Phytochemical Profiling, Antioxidant Activity, and Protective Effect against H₂O₂-Induced Oxidative Stress of *Carlina vulgaris* Extract. **Molecules**. V. 28. N° 5422. [s.l], 2023.

SU, Y. et al. Isoschaftoside Reverses Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Activating Autophagy In Vivo and In Vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 2022. N°1. China, 2022.

TEZUKA, D. Y. **Triagem de compostos anti-chagásicos com o *Trypanosoma cruzi* e leishmanicidas com as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi***. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos,

da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. São Carlos, 2015.

TOMASI, M. L. M.. **Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina) - Santa Catarina, 2021.

UCHIYAMA N. Antichagasic activities of natural products against Trypanosoma Cruzi. **Journal of Health Science**. V. 55, n° 1, p 31–39, Tokyo (2009).

VÁSQUEZ, M. E. M.. **Estudio Biodirigido de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências na Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas) - México, 2008.

VIEIRA, E.F.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.; DELERUE-MATOS, C.. Chayote (*Sechium edule*): a review of nutritional composition, bioactivities and potential applications. **Food Chemistry**, Portugal, 2018.

VINHAES, M. C. & DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16(Sup. 2):7-12, 2000.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatograph atlas**. 2 ed. Springer, 368 p Munich, 2001.

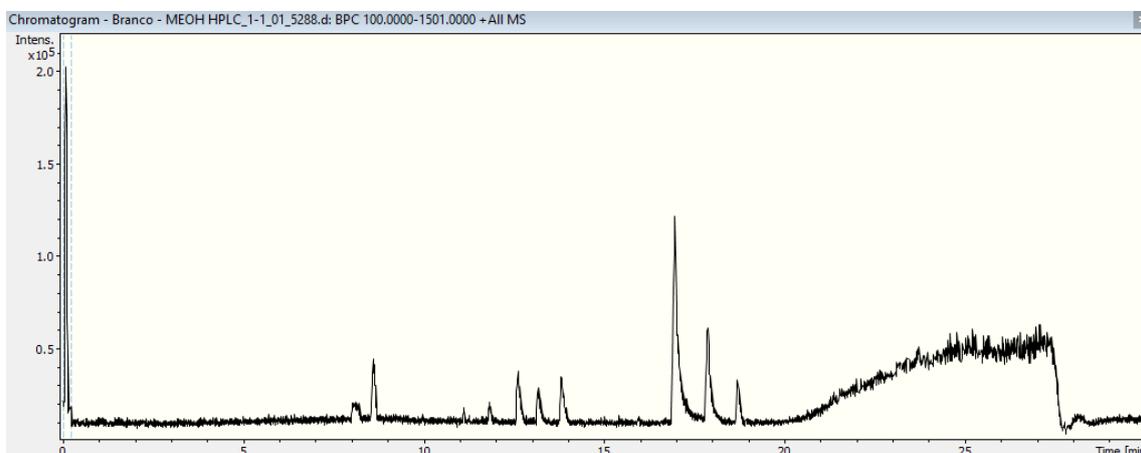
WHO. **Chagas disease (also know as American trypanosomiasis)**. World Health Organization. [S.l], 04 de abril, 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 03 de set. 2024.

ZENGIN, G., et al. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of Rhoifolin flavonoid: *in vitro* and *in silico* studies. **Chemistry & Biodiversity**. V. 20. N° 9. [S.l], 2023.

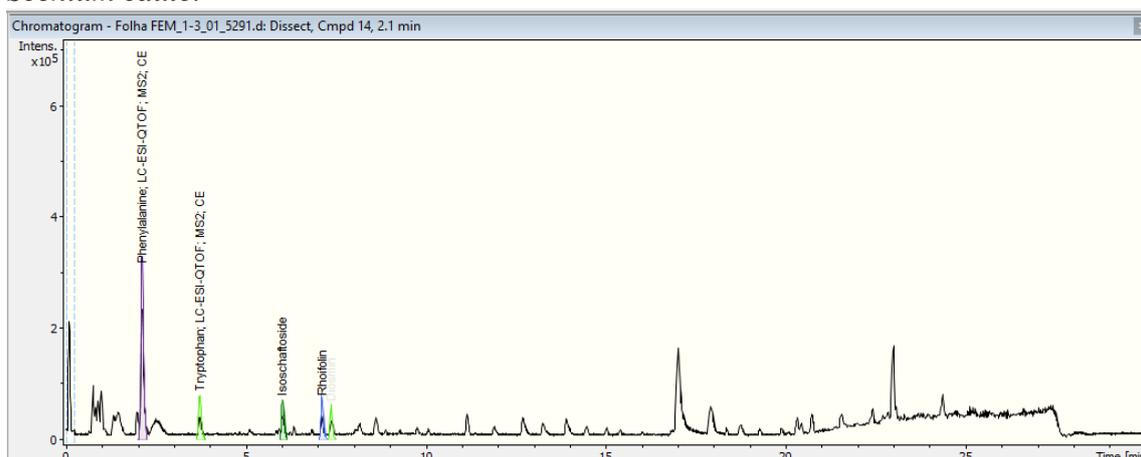
ZHENG, B., et al. Rhoifolin from *Plumula Nelumbinis* exhibits anti-cancer effects in pancreatic cancer via AKT/JNK signaling pathways. **Scientific Reports**. V. 12. N° 5654. [S.l], 2022.

ANEXOS

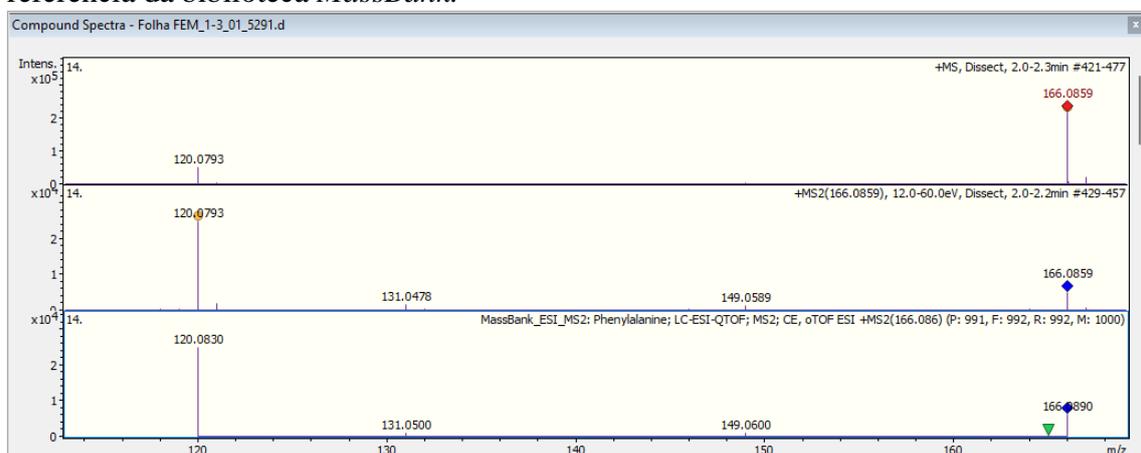
Anexo A – Cromatograma do branco (MEOH) para caracterização dos extratos etanólicos das folhas de *Sechium edule*.



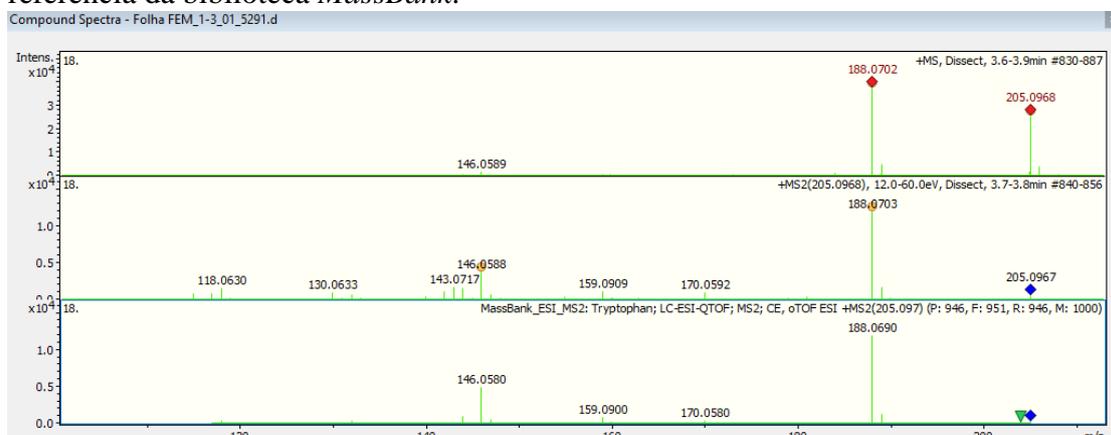
Anexo B – Cromatograma do extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*.



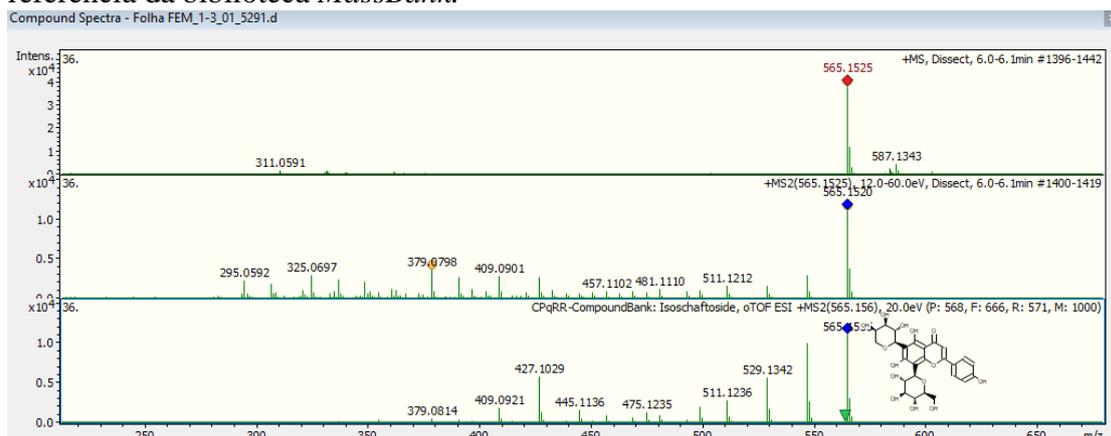
Anexo C – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 166.0859 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



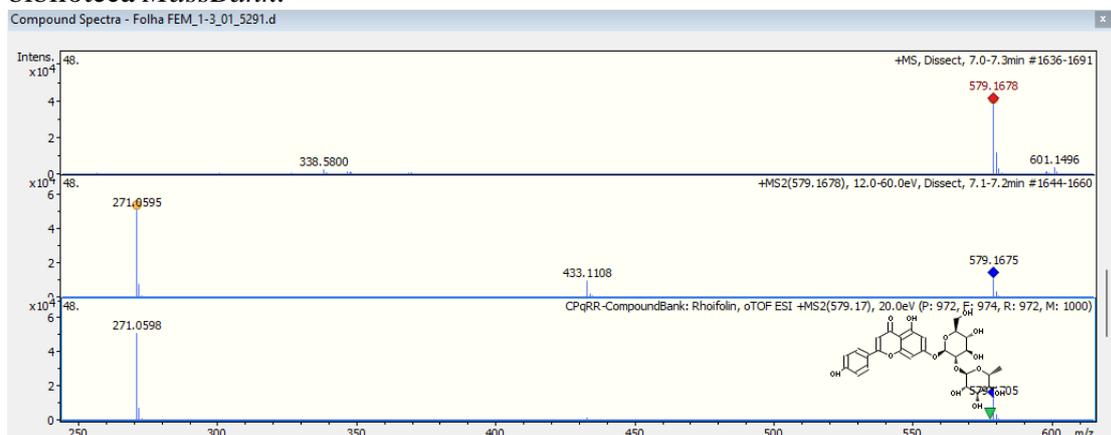
Anexo D – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 3.7 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 205.0967 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



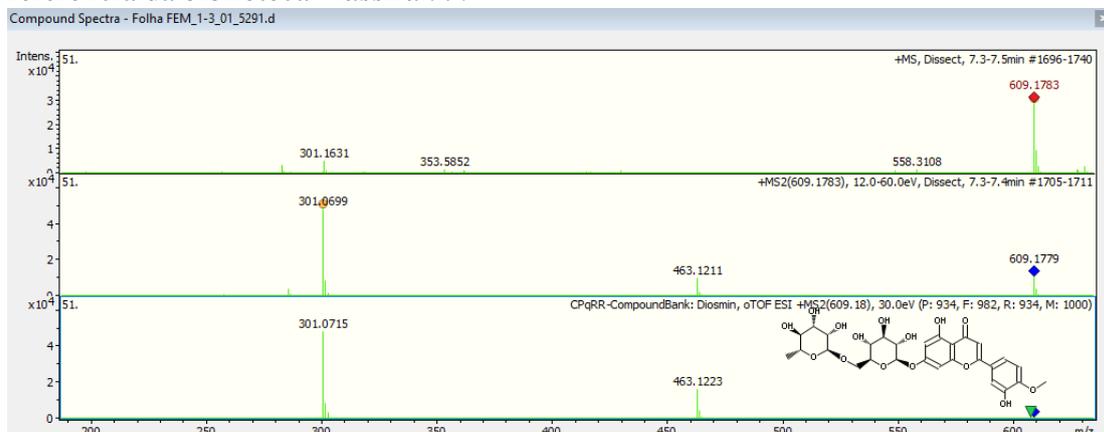
Anexo E – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 6.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 565.1525 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



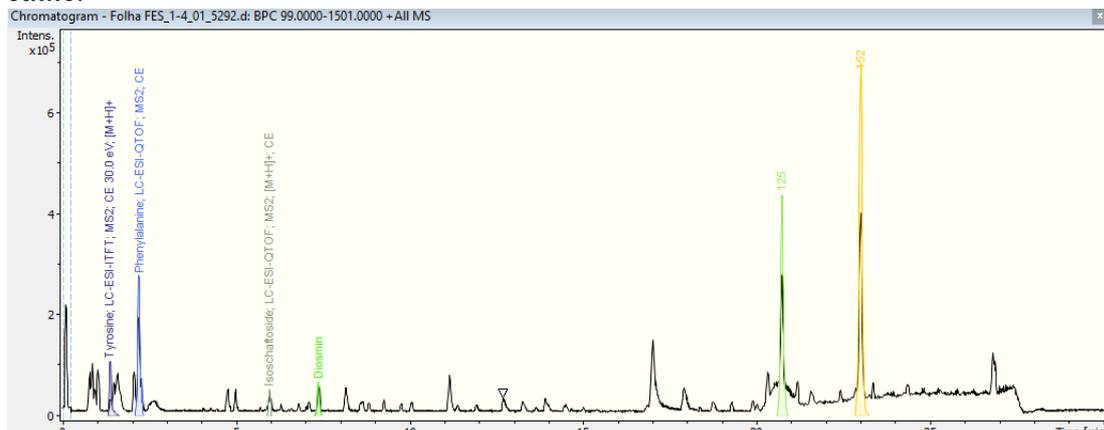
Anexo F – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 7.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 579.1678 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



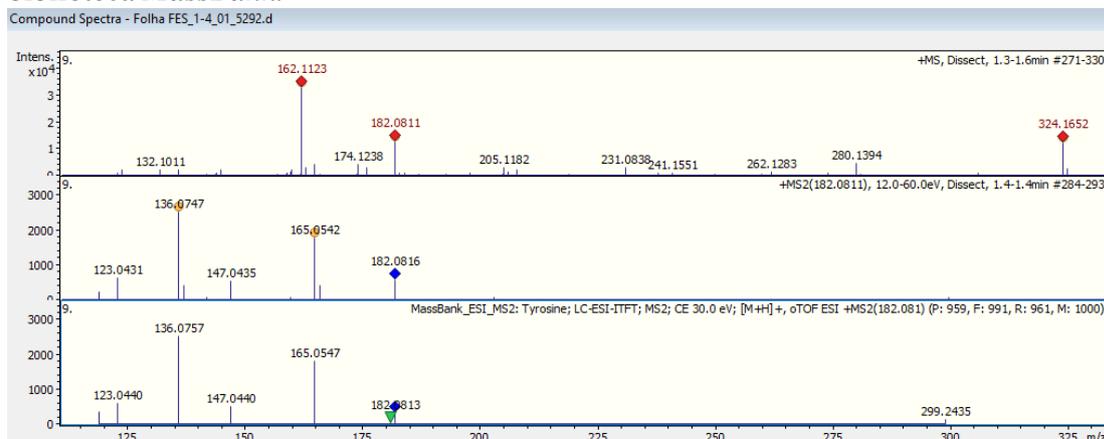
Anexo G – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por maceração (FFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 7.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 609.1779 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



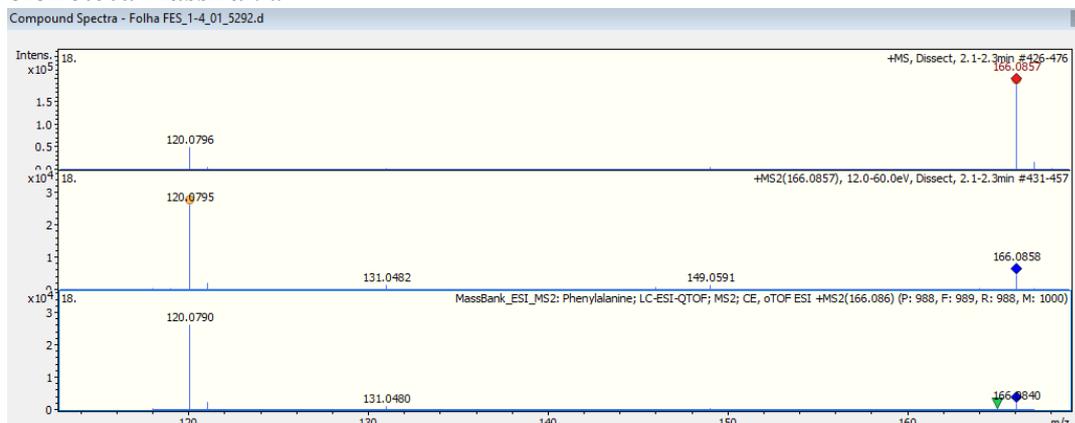
Anexo H – Cromatograma do extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*.



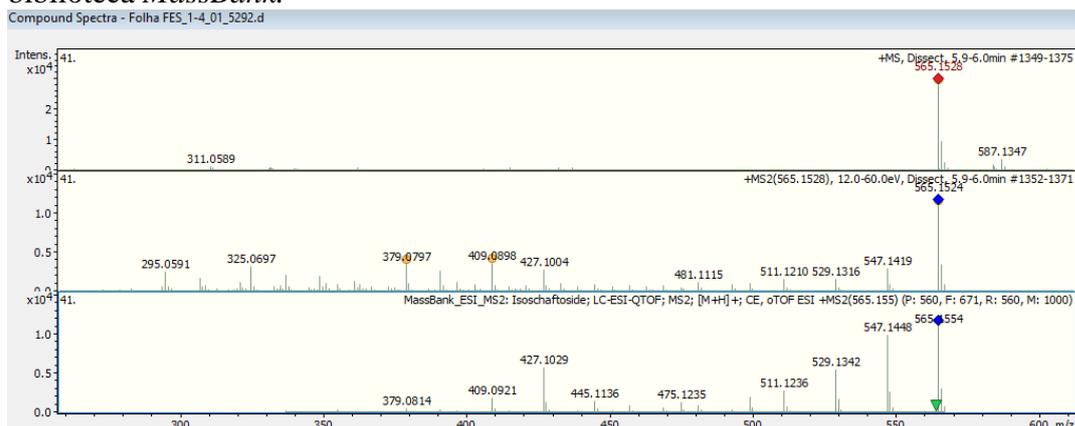
Anexo I – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 1.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 189.0816 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



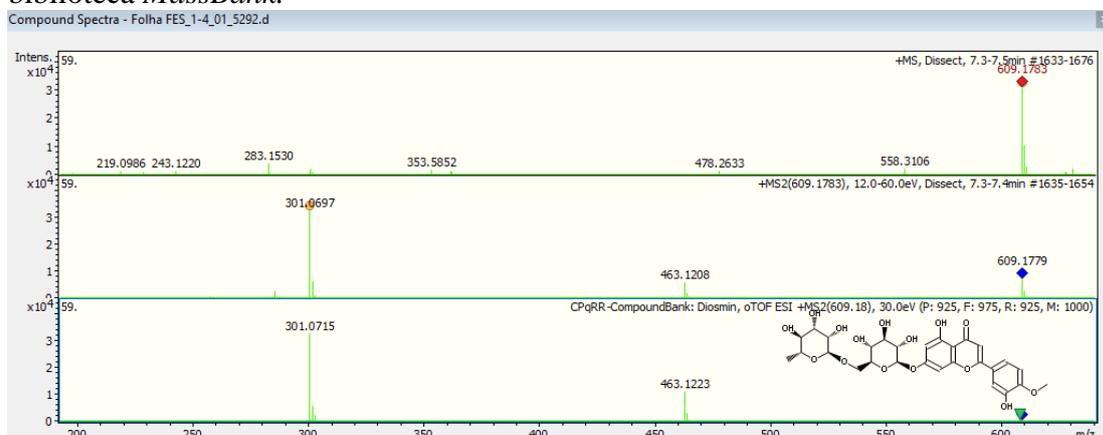
Anexo J – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.2 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 166.0857 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



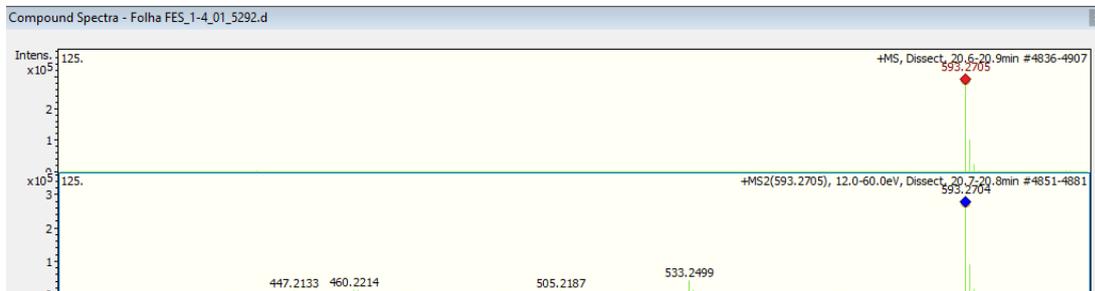
Anexo K – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 6.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 565.1528 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



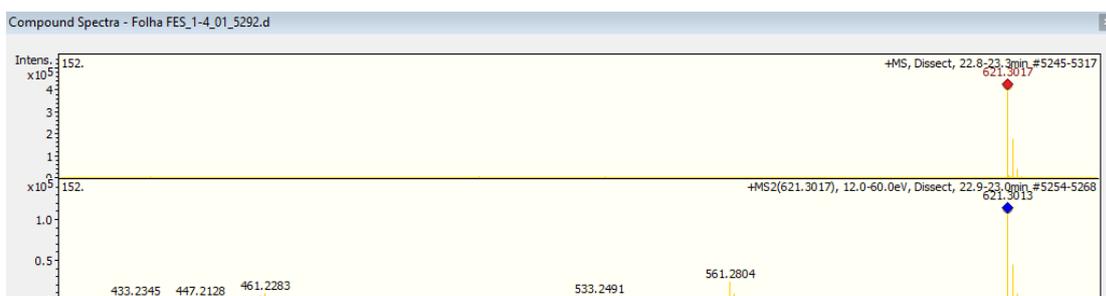
Anexo L – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 7.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 609.1783 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



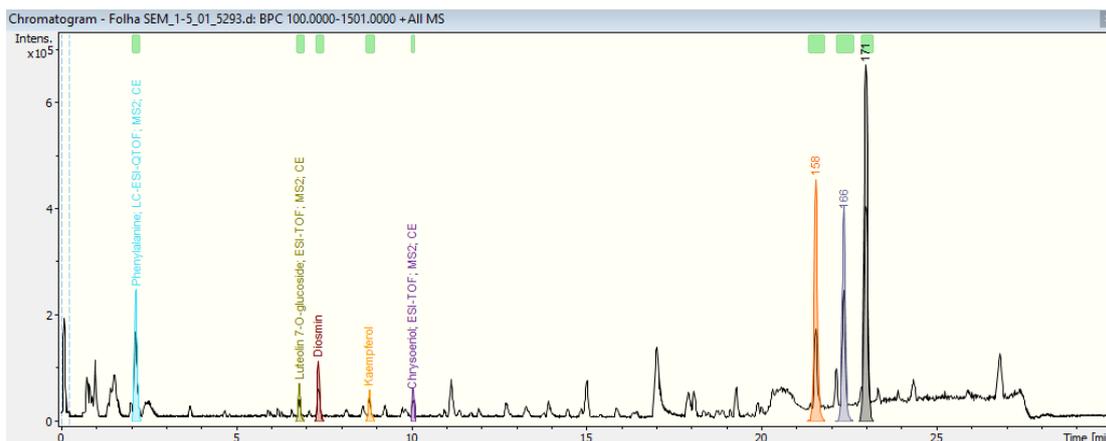
Anexo M – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 20.7 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 593.2705 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



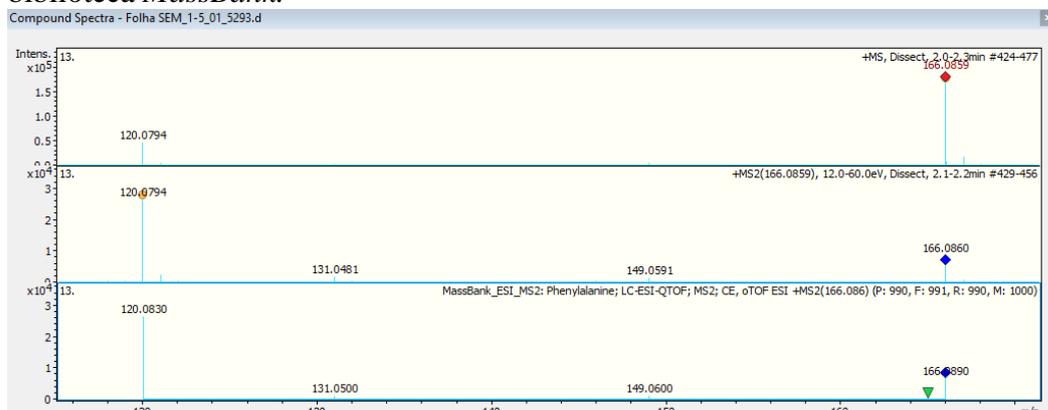
Anexo N – Dados espectrais para o extrato de folha fresca em etanol por Soxhlet (FFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 23.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 621.3017 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



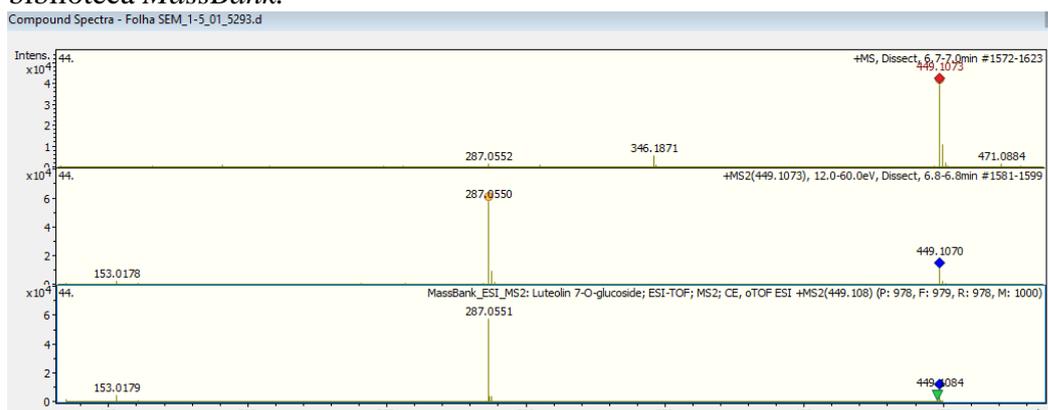
Anexo O – Cromatograma do extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*



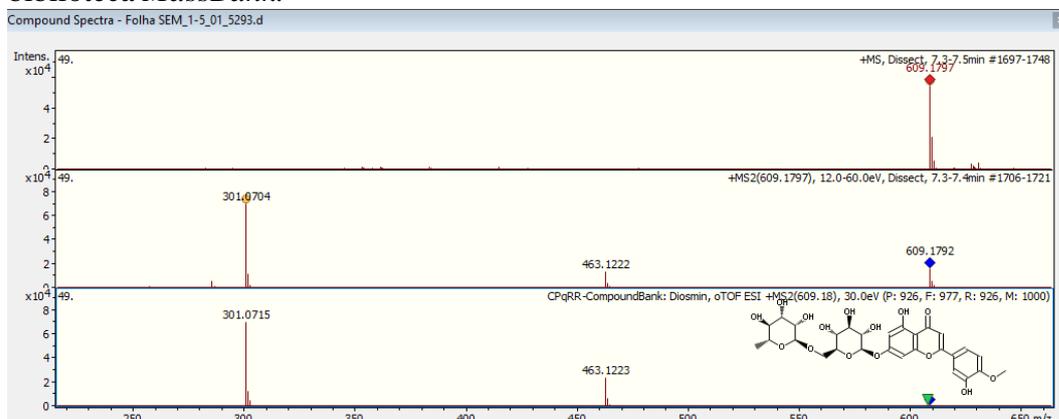
Anexo P – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 166.0859 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



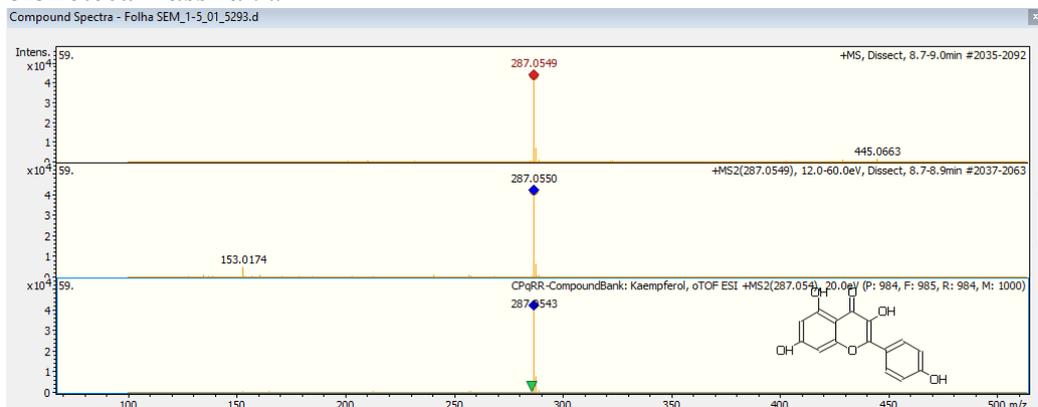
Anexo Q – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 6.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 449.1073 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



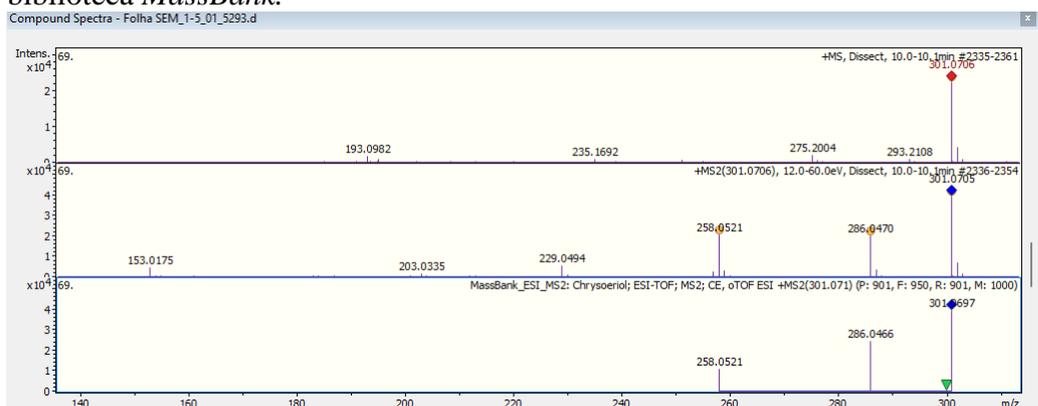
Anexo R – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 7.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 609.1797 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



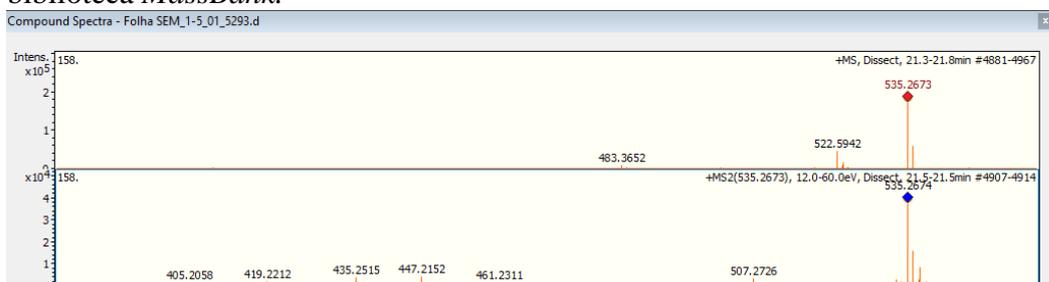
Anexo S – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 8.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 287.0549 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



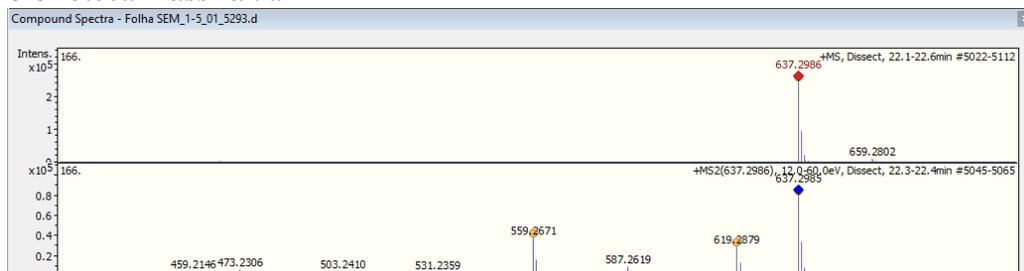
Anexo T – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 10.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 301.0706 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



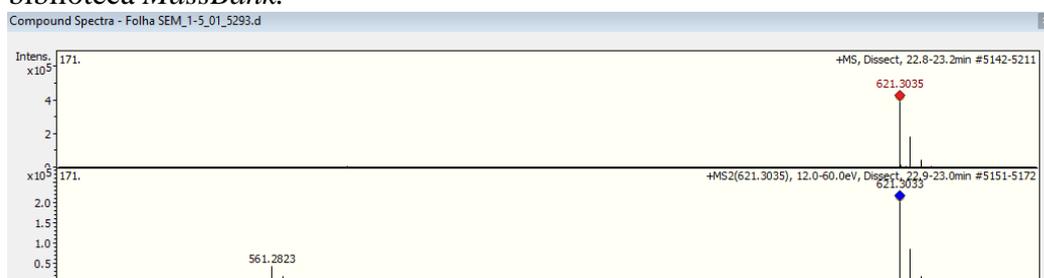
Anexo U – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 21.6 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 535.2673 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



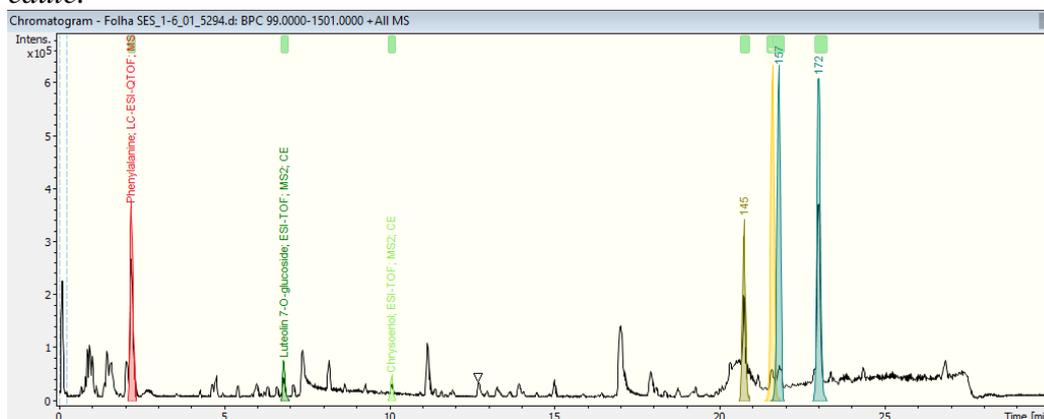
Anexo V – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 22.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 637.2986 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



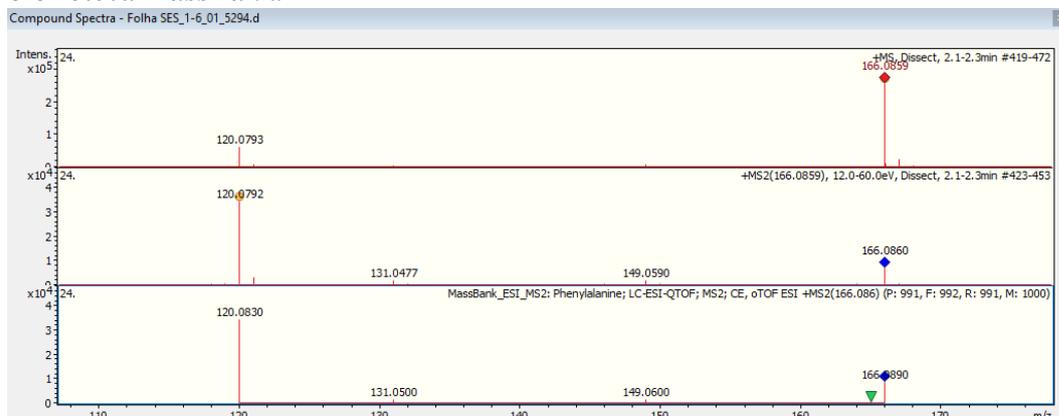
Anexo W – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por maceração (FSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 23.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 621.3035 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



Anexo X – Cromatograma do extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*.



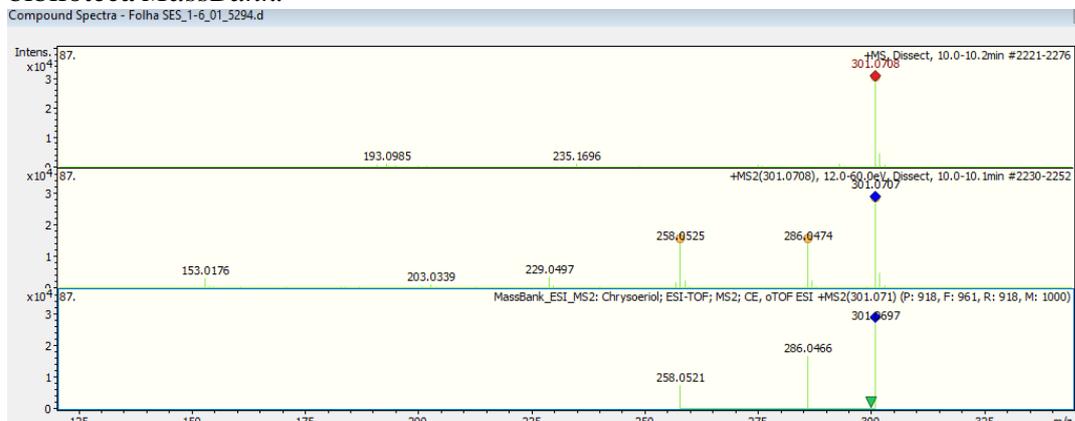
Anexo Y – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.2 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 166.0859 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



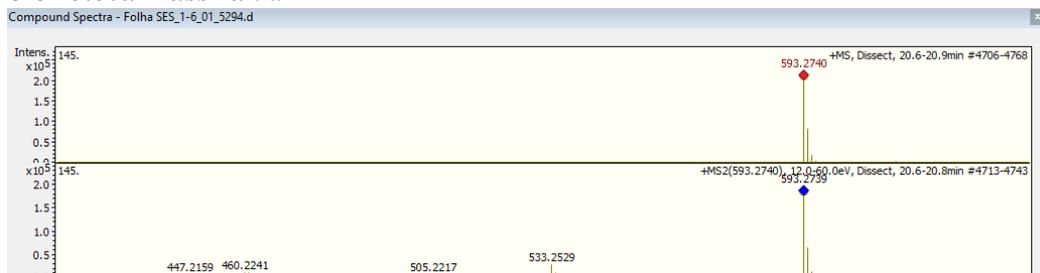
Anexo Z – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 6.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 449.1074 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



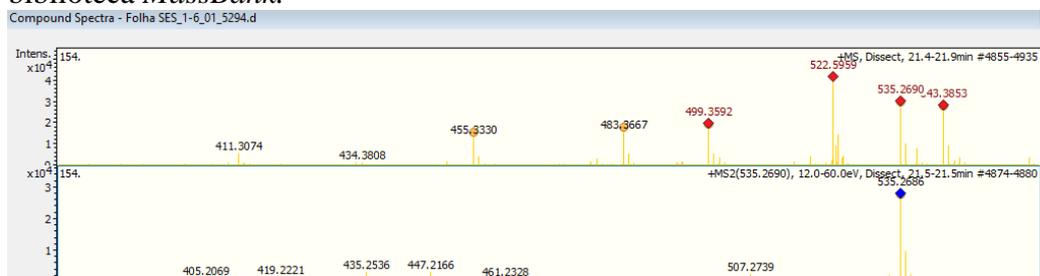
Anexo A1 – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 10.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 301.0708 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



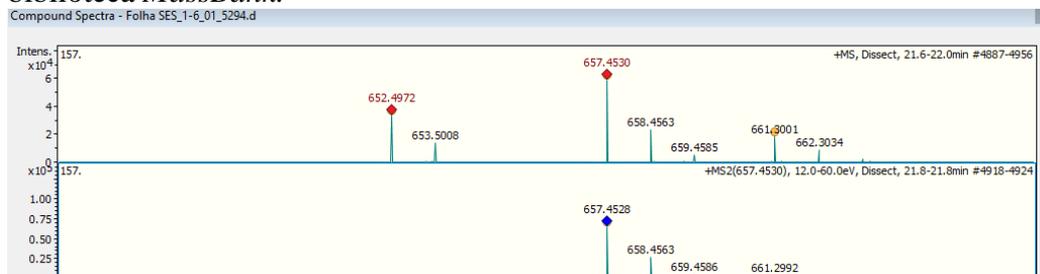
Anexo B1 – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 20.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 593.2740 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



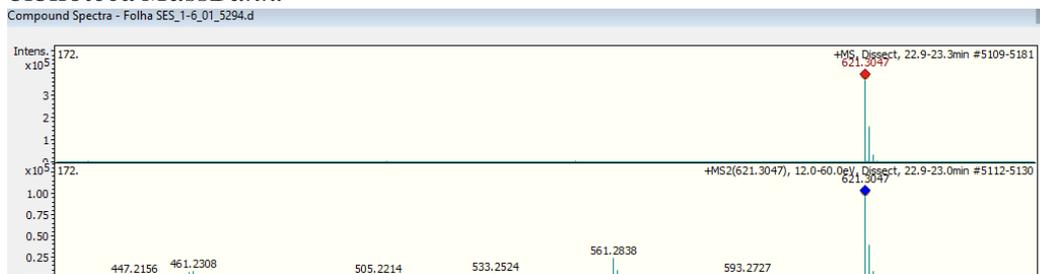
Anexo C1 – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 21.6 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 535.2690 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



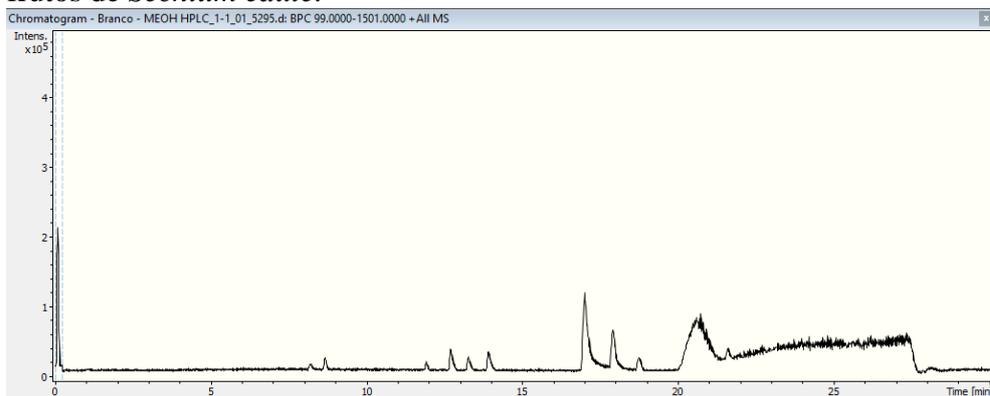
Anexo D1 – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 21.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 657.4530 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



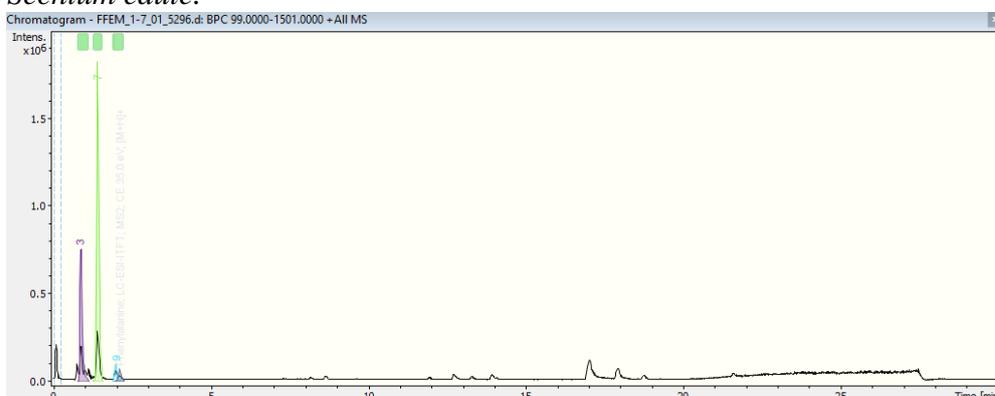
Anexo E1 – Dados espectrais para o extrato de folha seca em etanol por soxhlet (FSES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 23.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 621.3047 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



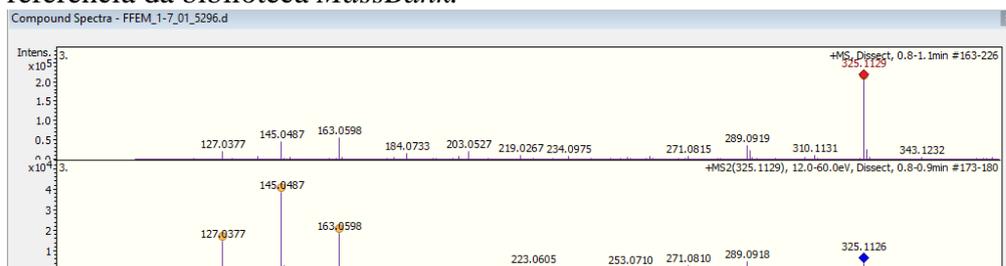
Anexo F1 – Cromatograma do branco (MEOH) para caracterização dos extratos etanólicos dos frutos de *Sechium edule*.



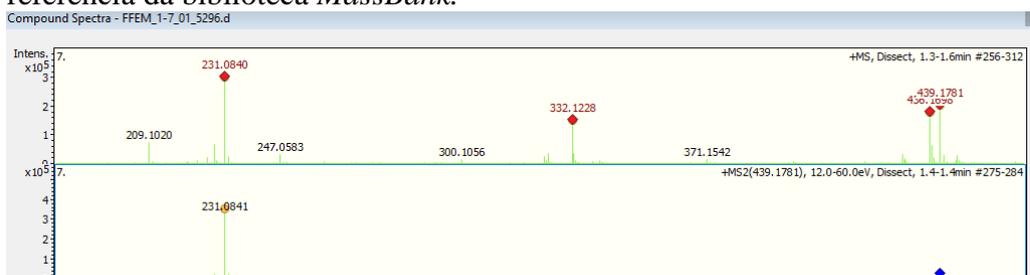
Anexo G1 – Cromatograma do extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRFEM) de *Sechium edule*.



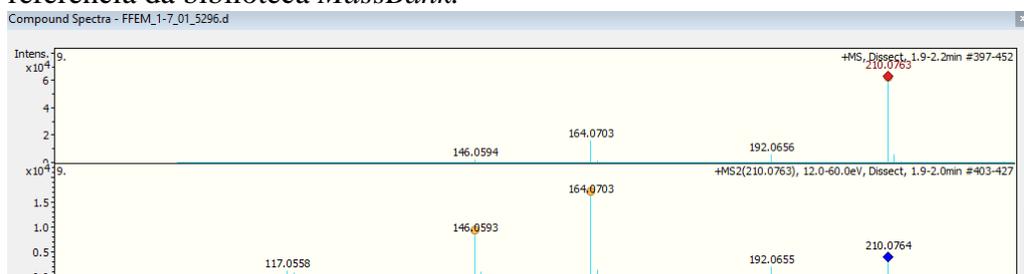
Anexo H1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 0.9 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 325.1129 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



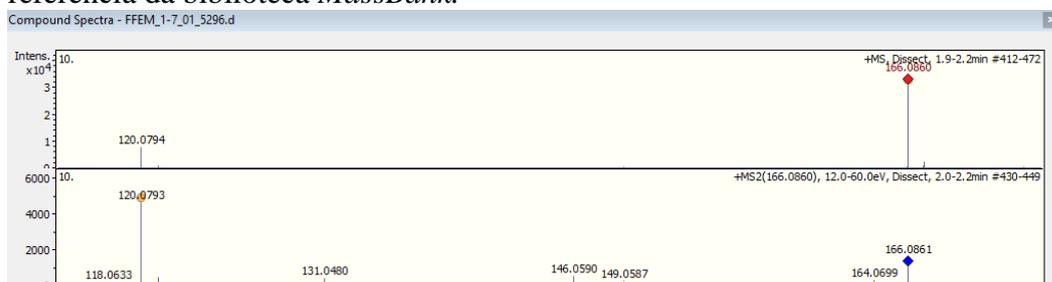
Anexo I1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 1.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 439.1781 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



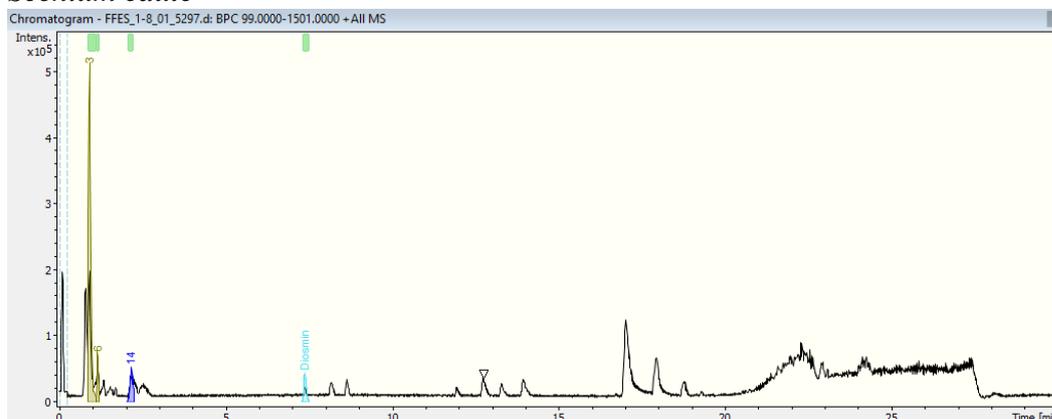
Anexo J1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.0 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 210.0763 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



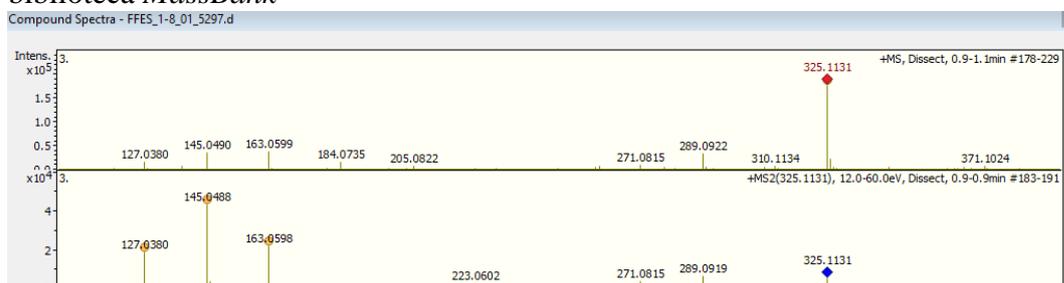
Anexo K1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRFEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.1 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 166.0860 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



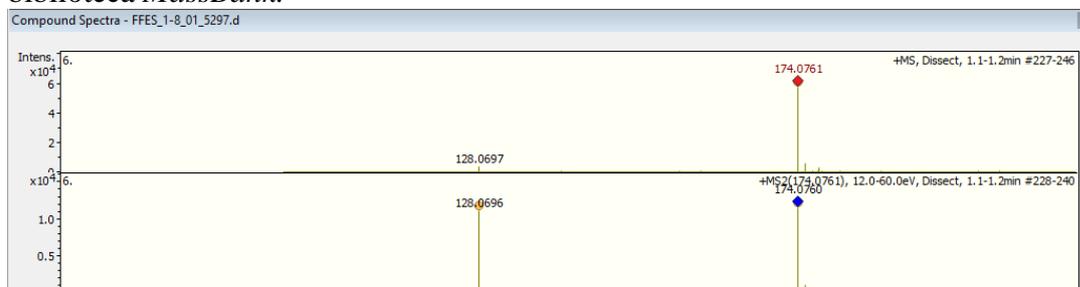
Anexo L1 –Cromatograma do extrato de fruto fresco em etanol por soxhlet (FRFES) de *Sechium edule*



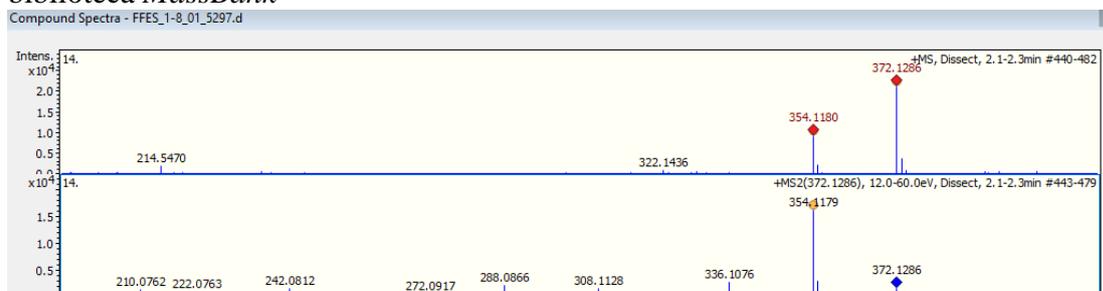
Anexo M1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por soxhlet (FRFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 0.9 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 325.1131 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*



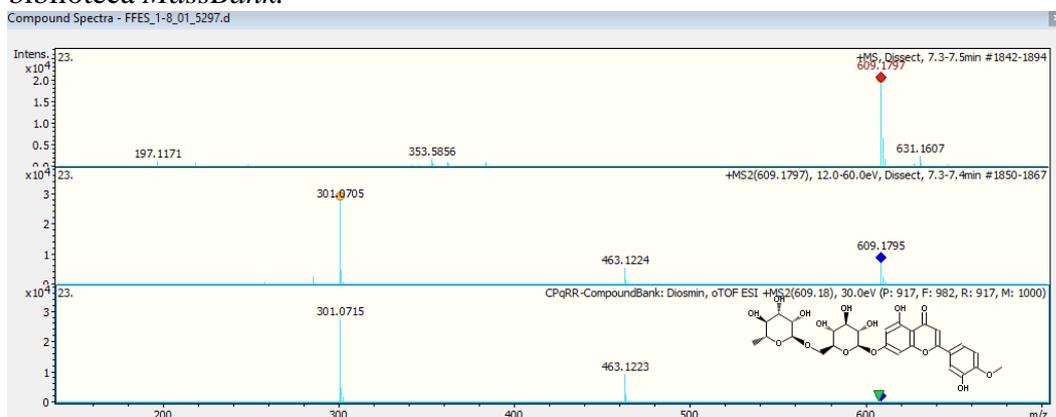
Anexo N1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por soxhlet (FRFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 1.2 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 174.0761 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



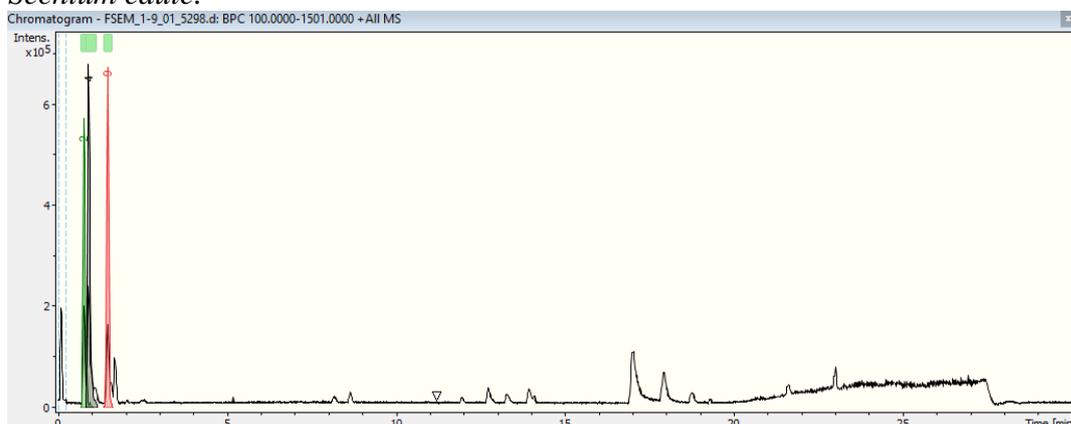
Anexo O1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por soxhlet (FRFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 2.2 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 372.1286 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*



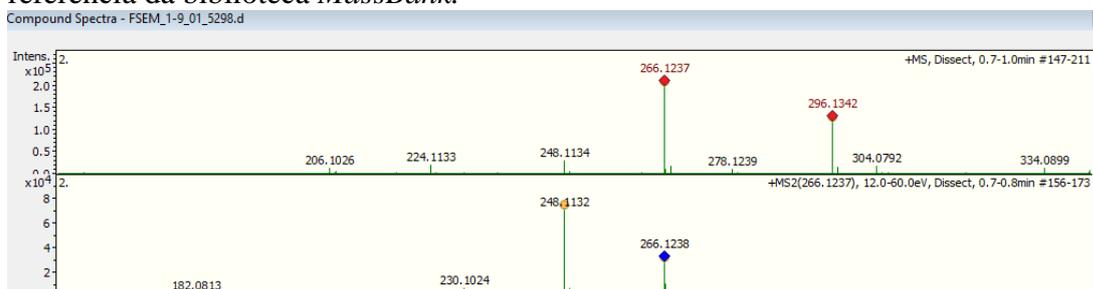
Anexo P1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por soxhlet (FRFES) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 7.4 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 609.1797 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



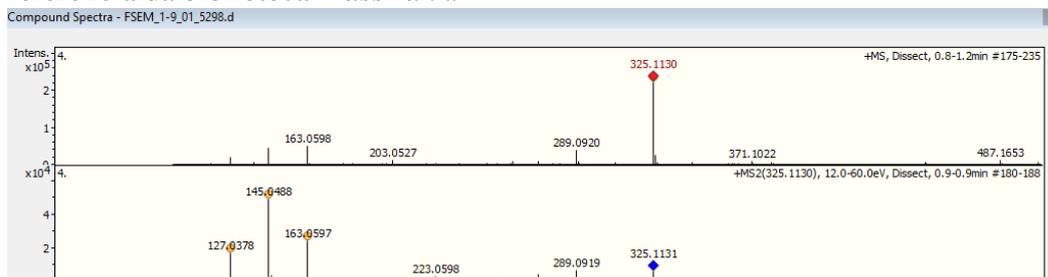
Anexo Q1 –Cromatograma do extrato de fruto seco em etanol por maceração (FRSEM) de *Sechium edule*.



Anexo R1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 0.8 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 266.1237 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



Anexo S1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 0.9 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 325.1130 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.



Anexo T1 – Dados espectrais para o extrato de fruto fresco em etanol por maceração (FRSEM) de *Sechium edule*: espectro de massas para o pico cromatográfico em TR igual a 1.5 min, espectro de fragmentação para o íon precursor 231.0840 e espectro de fragmentação de referência da biblioteca *MassBank*.

