



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MANOELA DAIELE GONÇALVES

***PINUS ELIOTTII:***  
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO  
DIIDROABIÉTICO E ATIVIDADE SOBRE *L. AMAZONENSIS*

---

Londrina  
2017

MANOELA DAIELE GONÇALVES

***PINUS ELIOTTII:***

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO  
DIIDROABIÉTICO E ATIVIDADE SOBRE *L. AMAZONENSIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa

Coorientadora: Profa. Dra. Ivete Conchon Costa

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gonçalves, Manoela Daiele.

Pinus eliottii : isolamento e identificação do ácido diidroabiético e atividade sobre L. amazonensis / Manoela Daiele Gonçalves. - Londrina, 2017.  
66 f. : il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.

Coorientador: Ivete Conchon Costa.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Tese. 2. Pinus eliottii - Tese. 3. Leishmaniose - Tese. 4. Diterpenos - Tese. I. Arakawa, Nilton Syogo. II. Costa, Ivete Conchon. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

MANOELA DAIELE GONÇALVES

***PINUS ELIOTTII:***

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO DIIDROABIÉTICO E  
ATIVIDADE SOBRE *L. AMAZONENSIS*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de fevereiro de 2017.

***“Obrigado Pai e Mãe por serem a luz  
da minha vida.”***

## AGRADECIMENTOS

Muitas batalhas foram enfrentadas quando decidi largar tudo e encarar o mestrado, e agradeço a Deus todos os dias por me permitir passar por tudo que passei.

A toda família por ser meu maior alicerce, principalmente a meu pai José e minha mãe Leonice por me amarem incondicionalmente, me apoiar em todas as minhas decisões e principalmente me ensinar que desistir nunca é o caminho que eu devo escolher seguir. A minha irmã Maria Gabriela por todo amor disfarçado de implicância e a minha vó Luzia por ser o maior exemplo de vida e por toda fé depositada no meu sucesso.

Ao meu padrinho Carlos que nunca mediu esforços para vir ao meu socorro, em todos os momentos. Às minhas madrinhas Val e Dedé por serem como mães nesse período longe de casa.

Agradeço ao meu orientador Dr. Nilton Syogo Arakawa não só pela orientação neste trabalho, mas sobretudo por toda a liberdade que me proporcionou me fazendo evoluir no campo da pesquisa, confiando no meu trabalho mesmo quando eu ainda não tinha nenhum conhecimento na área.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Ivete Conchon Costa e Dr. Wander Rogério Pavanelli por terem me acolhido em seu laboratório, me auxiliando e me guiando em toda a parte biológica, sendo essencial para o meu crescimento.

Às professoras Dra. Idessania Nazareth Costa e Ms. Francine Nesello Melanda, por toda amizade, e por contribuírem na minha formação, dando exemplos de competência e dedicação.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia que colaboraram na parte inicial do trabalho.

Aos amigos Andressa Gesuato, Barbara Fernandes, Bruno Simões, Camila Poliseli, Danielli Nardino, Ellenn de Marchi, Filipe Martinez, Gabriela Salgado, José Eduardo, Julia Ansaneli, Lucas Camargo, Maiara Taniguchi, Priscila Camargo e Renan Marim por serem minha melhor válvula de escape quando a pressão acadêmica surgia.

A todos os meus amigos do Laboratório especialmente a Amanda Carloto, Bruna Bortoleti, Fernanda Tomiotto, João Paulo Assolini e Milena Menegazzo por

deixarem meus dias mais alegres, por não economizarem exemplos na hora de me transmitir conhecimento e por principalmente confiar no meu trabalho, com toda certeza são grandes amigos que levarei para a vida toda.

A Universidade Estadual de Londrina pela estrutura, ao programa de pós graduação em química, Professora Elisa Yoko Hirooka (NANOBIO-CAPES-MCTI) pelo suporte financeiro (na obtenção do ácido diidroabiético), ao LAB SPEC-FINEP UEL pela aquisição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , principalmente a estagiária Vanessa Liberatti pelas análises de RMN a todos os professores e colaboradores que auxiliaram direta e indiretamente na realização desse trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a execução deste mestrado, principalmente por acreditarem em mim e por compartilharem da felicidade desse dia enfim chegar.

Obrigada

“Um especialista é um homem que sabe  
cada vez mais sobre cada vez menos”

Dr. William J. Mayo

GONÇALVES, Manoela Daiele. ***Pinus eliottii***: isolamento e identificação do ácido diidroabiético e avaliação da atividade leishmanicida. 2017. 66. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Devido à alta toxicidade e ineficácia dos fármacos atuais para o tratamento da leishmaniose, a busca por novos compostos com ação leishmanicida tem sido motivo de investigação por vários pesquisadores. O ácido diidroabiético (AD) isolado da planta *Pinus eliottii* apresenta diversas atividades biológicas como antimicrobiana, analgésica, antitumorais, além de apresentar atividade tripanocida. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a ação deste composto frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Para isso foi fracionada a resina de *Pinus eliottii* por meio de cromatografia líquida a vácuo a e por gradiente crescente de polaridade (Hexano:Acetato de etila), posteriormente, monitorou-se por cromatografia de camada delgada comparativa. Foi observado nas análises um composto majoritário, com formação de cristais, os quais foram submetidos a lavagem com metanol em baixa temperatura e analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , identificando o AD. Após o isolamento e identificação, verificou-se a ação leishmanicida direta sobre formas promastigotas, em que obteve-se um  $\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$  ou  $0,133 \mu\text{M}$  após 24 horas de tratamento. Essa concentração de AD foi capaz de induzir alterações morfológicas no parasito. Ainda, houve um aumento de exposição de fosfatidilserina, produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilidade da membrana plasmática pela marcação com Anexina V, sonda  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  e iodeto de propídio, respectivamente. O tratamento com AD foi capaz de reduzir a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago, sem apresentar efeitos citotóxicos sobre macrófagos e eritrócitos nas concentrações de 40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$ . Ademais, o tratamento não modulou a produção de citocina e óxido nítrico por macrófagos infectados pelo parasito, todavia houve aumento na produção de EROs. Com base nos resultados, concluiu-se que o tratamento com AD proveniente do *P. eliottii* apresenta atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e sobre macrófagos infectados pela produção de EROs ou atividade direta do AD. O composto apresenta-se como potencial alternativa terapêutica, merecendo estudos adicionais pré-clínicos e clínicos como uma possível terapia para a infecção por *Leishmania*.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Diterpenos. Ácido diidroabiético. Atividade leishmanicida. Mecanismos de morte. *Pinus*.

GONÇALVES, Manoela Daiele. *Pinus elliottii*: isolation and identification of dehydroabietic acid and evaluation of leishmanicidal activity. 2017. 66. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Due to the high toxicity and inefficacy of current drugs for the treatment of leishmaniasis, the research for new compounds with leishmanicidal activity has been investigated. The dihydroabietic acid (DA), isolated from *Pinus elliottii*, presents several biological activities, such as antimicrobial, analgesic, antitumor, as well as trypanocidal activity. Therefore, the present work had as objective to verify the action of this compound against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. Herein, the *Pinus elliottii* resin was fractionated by vacuum liquid chromatography by increasing polarity gradient (Hexane:ethyl acetate), further monitored by comparative thin-layer chromatography, which was observed a major compound with crystals formation, which were washed with cold methanol and subsequently analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, identifying DA. After isolation and identification, the direct leishmanicidal action on promastigote forms was verified, where it obtained an  $\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{g} / \text{mL}$  or  $0.133 \mu\text{M}$  after 24 hours of treatment. This concentration of DA was able to induce morphological changes in the parasite, in addition to increasing phosphatidylserine exposure, reactive oxygen species production and plasma membrane permeability by Annexin V,  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  probe and propidium iodide, respectively. DA treatment was able to reduce the percentage of infected macrophages and the number of amastigotes by macrophage, without presenting cytotoxic effects on macrophages and erythrocytes at concentrations of 40, 50 and  $75 \mu\text{g}/\text{mL}$ . In addition, the treatment did not modulate the cytokine and nitric oxide production by macrophages infected by the parasite, however there was an increase in ROS production. Based on the results, it was concluded that the treatment with DA from *P. elliottii* presents leishmanicidal activity on promastigote forms and on macrophages infected by the production of ROS or direct activity of DA. This compound indicated as a potential therapeutic alternative, deserving additional preclinical and clinical studies as a possible therapy for *Leishmania* infection.

**Keywords:** Natural products. Diterpenes. Dehydroabietic acid. Leishmanicidal activity. Mechanisms of death. *Pinus*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Exemplo de produtos naturais utilizados de forma medicinal.....	13
<b>Figura 2-</b>	Representação do <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> e algumas características.....	15
<b>Figura 3-</b>	Classificação dos terpenos .....	16
<b>Figura 4-</b>	Representação dos ácidos resínicos.....	17
<b>Figura 5-</b>	Estrutura do ácido diidroabiético .....	18
<b>Figura 6-</b>	Principais fármacos no tratamento da leishmaniose .....	23
<b>Figura 7-</b>	Compostos químicos com atividade leishmanicida comprovada em formas promastigotas e/ou amastigotas.....	24
<b>Figura 8-</b>	Atividade leishmanicida do ácido diidroabiético sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	40
<b>Figura 9-</b>	Microscopia eletrônica de varredura mostrando alterações morfológicas nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	42
<b>Figura 10-</b>	Mecanismo de morte induzido pelo ácido diidroabiético em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	43
<b>Figura 11-</b>	Citotoxicidade do ácido diidroabiético.....	44
<b>Figura 12-</b>	Atividade do ácido diidroabiético sobre macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	45
<b>Figura 13-</b>	Ação do ácido diidroabiético na recuperação de formas promastigotas a partir de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	47
<b>Figura 14-</b>	Níveis de citocinas produzidas <i>in vitro</i> por macrófagos infectados ou não e tratados ou não com ácido diidroabiético.....	48
<b>Figura 15-</b>	Produção de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e EROs em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com AD .....	50
<b>Figura 16-</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do AD (400,13 MHz) CDCl <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 17-</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do AD (100,61 MHz) CDCl <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 18-</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do AD (400,13 MHz) expansão na região de 6,80 a 7,95 ppm .....	61
<b>Figura 19-</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do AD (400,13 MHz) expansão na região de 2,65 a 3,35 ppm .....	62

<b>Figura 20-</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do AD (400,13 MHz) expansão na região de 2,10 a 2,50 ppm .....	62
<b>Figura 21-</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,70 a 2,10 ppm .....	62
<b>Figura 22-</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,40 a 1,70 ppm .....	63
<b>Figura 23-</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,10 a 1,40 ppm .....	63
<b>Figura 24-</b>	Espectro de HSQC do AD em $\text{CDCl}_3$ .....	63
<b>Figura 25-</b>	Espectro de HSQC do AD em $\text{CDCl}_3$ expansão na região de 6,60 a 7,40 ppm .....	64
<b>Figura 26-</b>	Espectro de HSQC do AD em $\text{CDCl}_3$ expansão na região de 2,00 a 3,02 ppm .....	64
<b>Figura 27-</b>	Espectro de HSQC do AD em $\text{CDCl}_3$ expansão na região de 1,00 a 1,50 ppm .....	64
<b>Figura 28-</b>	Cromatografia do AD empregando o UPLC-MS/MS .....	65
<b>Figura 29-</b>	Espectro de massa atribuído ao ácido diidroabiético m/z 299,41 empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo do diterpeno <i>Pinus elliottii</i> em gradiente crescente de polaridade e rendimentos obtidos das frações .....	36
<b>Tabela 2-</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400,13 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	37
<b>Tabela 3-</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	38
<b>Tabela 4-</b>	Regras de Lipinski realizada para o ácido diidroabiético.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µM	Micromolar
AcOEt	Acetato de Etila
AD	Ácido diidroabiético
Amb	Anfotericina B
B.O.D	do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BALB/c	Camundongo de linhagem lisogênica
C10	Monoterpenos
<sup>13</sup> C	Carbono 13
C15	Sesquiterpenos
C20	Diterpenos
C25	Sesterpenos
C30	Triterpenos
C40	Tetraterpenos
C5	Hemiterpenos
CCCD	Cromatografia Comparativa em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CLV	Coluna Líquida a Vácuo
cm <sup>2</sup>	centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cobre
D <sub>2</sub> O	Água Deuterada
D	Dupleto
Dd	duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio

G	Gramas
H	Horas
<sup>1</sup> H	Hidrogênio 1
H <sub>2</sub> DCFDA	2'7' diclorofluoresceína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
Hex.	Hexano
Hz	Hertz
IC50	do inglês <i>inhibitory concentration</i> 50%
ICR	Linhagem de camundongo não isogênico
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IP	Iodeto de propídio
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B4
<i>M</i>	Multipeto
M	Molar
MCP-1	Monócitos 1
MHz	Mega-hertz
mL	Microlitro
Mm	Milímetros
mM	Milimol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanômetro

NO	do inglês <i>Nitric Oxide</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
Pf	Ponto de Fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPAR $\alpha/\gamma$	do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Ppm	Partes por milhão
Rpm	Rotação por Minuto
RPMI 1640	Meio de cultura ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SBF	Soro Bovino Fetal
Sept	Septet
TH1	do inglês <i>T- helper 1</i>
TH2	do inglês <i>T-helper 2</i>
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Fator de necrose tumoral
UPLC	do inglês <i>Ultra performance liquid chromatography</i>
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinco
$\Delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	PRODUTOS NATURAIS .....	12
1.2	PINACEAE.....	13
1.2.1	<i>Pinus elliotii</i> .....	14
1.3	TERPENOS.....	15
1.3.1	Diterpenos .....	16
1.3.2	Estudos Biológicos Realizados com o Ácido Diidroabiético .....	17
1.4	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS .....	19
1.4.1	Leishmaniose .....	19
1.4.2	Imunopatogenia na Leishmaniose Tegumentar Americana.....	21
1.4.3	Tratamentos .....	22
1.4.4	Atividade Leishmanicida dos Produtos Naturais.....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
3.1	OBTENÇÃO DA RESINA.....	27
3.2	PREPARO DA OLEORESINA E ISOLAMENTO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO .....	27
3.3	IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO .....	27
3.3.4	ESTUDO <i>IN SILICO</i> DO ÁCIDO DIIDROABIÉTICO .....	28
3.5	MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> .....	29
3.6	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL .....	29
3.7	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO DIIDROABIÉTICO SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	29
3.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	30
3.9	DETERMINAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA.....	30
3.10	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM FORMAS PROMASTIGOTAS .....	31
3.11	DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR .....	31

3.12	EFEITO CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS .....	31
3.13	ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	32
3.14	ENSAIO LEISHMANICIDA EM FORMAS AMASTIGOTAS .....	32
3.15	TESTE DE RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS .....	33
3.16	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS .....	34
3.17	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRITO COMO ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE NO.....	34
3.18	DETERMINAÇÃO DE EROS EM MACRÓFAGOS .....	34
3.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
4.1	PREPARO DA OLEORESINA, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO MAJORITÁRIO .....	36
4.2	ESTUDO <i>IN SILICO</i> DO ÁCIDO DIIDROABIÉTICO .....	38
4.3	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO AD SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	39
4.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	40
4.5	MECANISMOS DE MORTE ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM AD SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS .....	41
4.6	EFEITO CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS E ERITRÓCITOS.....	44
4.7	ENSAIO LEISHMANICIDA SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS.....	45
4.8	TESTE DE RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS .....	46
4.9	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS .....	47
4.10	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NO E EROS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	49
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIA .....</b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>61</b>
	APÊNDICE A – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do ácido diidroabiético .....	61
	APÊNDICE B – UPLC/MS .....	65
	APÊNDICE C – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética Animal.....	66

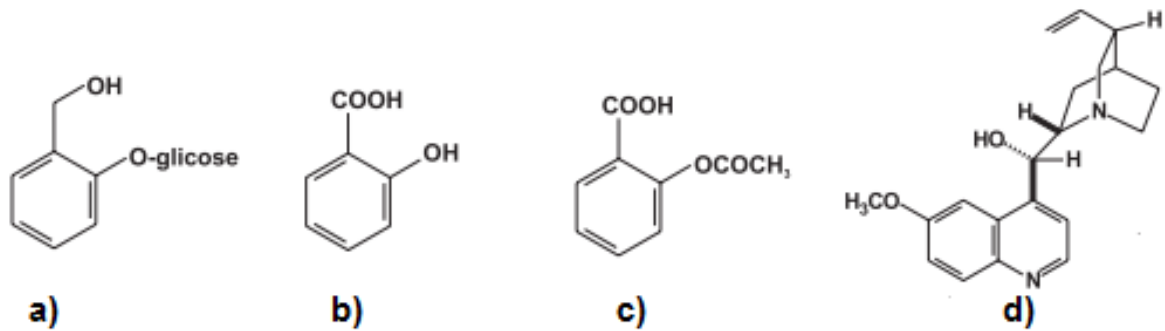
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos naturais

Os produtos naturais se destacam como um recurso acessível ao ser humano, auxiliando na melhora de sintomas e até mesmo na cura de enfermidades. Pertencem a cinco grandes classes químicas: os carboidratos, os lipídios, os compostos nitrogenados (aminoácidos, peptídeos, proteínas, alcalóides), os fenilpropanoides e os terpenóides, constituindo uma fonte rica de compostos com diversas aplicações nos campos da medicina, farmácia e biologia (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). O interesse para o desenvolvimento de novas terapias se dá quando existe uma correlação entre os componentes fitoquímicos e a atividade farmacológica de uma planta (BELLIK et al., 2012; HARVEY, 2008). Um composto é biologicamente ativo quando exerce alguma ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo (PLETSCHI, 1995).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que atualmente 80% dos medicamentos possuem algum composto natural e/ou envolvem o uso de seus constituintes ativos (WHO, 2016). O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo contando com mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos, dentre as quais apenas 55.000 espécies são catalogadas (GORDALIZA, 2009; VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O uso empírico de produtos naturais de forma medicinal pela população mostra que diferentes partes da planta apresentam eficiência no tratamento de diversos males, elevando o interesse no estudo científico dos produtos naturais como por exemplo os salicilatos obtidos de *Salix alba* e a quinina isolada das cascas de espécies de *Cinchona*, utilizada por mais de trezentos anos como único princípio ativo contra a malária (Figura 1) (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).



**Figura 1** – Exemplo de produtos naturais utilizados de forma medicinal. Salicilatos a) salicina b) ácido salicílico e c) ácido acetil-salicílico e antimalárico d) quinina provenientes de fontes naturais. Fonte: Adaptado de VIEGAS e colaboradores (2006).

Pesquisadores em todo o mundo estão voltados para o isolamento e identificação de novos compostos de origem natural, que podem ser utilizados como matéria-prima base ou material de partida para a obtenção de compostos que apresentem eficácia elevada, menor citotoxicidade e que possuam algum tipo de atividade benéfica para a saúde dos seres humanos, visto que alguns compostos naturais têm sua atividade potencializada ao sofrer modificações químicas (GORDALIZA, 2007, 2009; LANGER et al., 2007; SHAW, 2009; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

A identificação dos constituintes químicos presentes em uma planta contribui principalmente na descoberta dos mecanismos de ação do princípio ativo (FILHO; YUNES, 1998). Técnicas como cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS), contribuem na rápida elucidação de estruturas moleculares, auxiliando na obtenção de compostos parcialmente ou totalmente purificados (BUTLER, 2004; EXARCHOU et al., 2005, 2006; KOEHN; CARTER, 2005; TATSIS et al., 2007).

## 1.2 Pinaceae

Pinaceae é uma das maiores e mais difundidas famílias de coníferas, sendo considerada como um grupo de gimnosperma ecologicamente diversa, que produz uma considerável quantidade de biomassa, além de fornecer um *habitat* para outros

organismos e, economicamente, é importante devido ao seu potencial como fonte de madeira, celulose e resinas (FALCON-LANG; MAGES; COLLINSON, 2016; KRUTOVSKY et al., 2004; SMITH et al., 2016)

Pinaceae é composta por aproximadamente 250 espécies, distribuídas em 11 gêneros (GERNANDT et al., 2008; SMITH et al., 2016). São nativas do hemisfério norte, podendo ocupar diversos *habitat* (árido até o tropical), com condições ambientais amplas, incluindo solos pobres em nutrientes, ácidos, temperaturas variadas e disponibilidade de água extremamente baixas (GERNANDT et al., 2008; MARTINEZ-VILALTA; SALA; PIÑOL, 2004).

A principal característica desta família é a presença de folhas em formas de agulhas, sendo conhecida como coníferas, devido à produção de cones ovulados com escamas independentes como estruturas reprodutoras (SMITH et al., 2016).

#### 1.2.1 *Pinus elliottii*

*Pinus elliottii* é uma conífera pertencente à família Pinaceae, explorada comercialmente pela produção de resina. No gênero *Pinus* se destacam mais de 100 espécies, sendo a *Pinus elliotti* Engelm diferenciada em duas variedades: *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* var. *densa*, onde a primeira se destaca por sua importância comercial (KAMM et al., 1996). Apresentam hábito arbóreo, podendo chegar a 30 metros de altura, possuem folhas de coloração verde escura intensa, perenifólias, apresentando formato de agulhas, com um feixe vascular rodeado por uma bainha, em cada lateral. Seu fruto é escamado com formato cônico e os canais de resina encontram-se em uma região abaixo do floema, ao lado as células parenquimáticas possuem vacúolos contendo taninos (Figura 2) (LANGENHEIM, 2003).



**Figura 2** - Representação do *Pinus elliottii* var. *elliottii* e algumas características. A) Árvore do gênero *P. elliottii* podendo alcançar 30 metros de altura; B) folhas em formato de agulhas apresentando coloração verde escuro intenso e C) fruto escamado com formato cônico. Fonte: Disponível em: <http://floridata.com/Plants/Pinaceae/Pinus%20elliottii/84>.

Devido aos anéis de crescimento, o tronco apresenta camada suberosa espessa, sendo na madeira onde se encontram os extratos de elevado valor comercial, como a resina composta principalmente por terebintina, a fração volátil mono e sesquiterpênica, e o breu, a fração não volátil diterpênica (KEELING; BOHLMANN, 2006; MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003).

A produção de resina está diretamente relacionada ao mecanismo de defesa da planta contra fungos patogênicos e insetos predadores da casca, que são os maiores responsáveis pelas doenças que acometem as espécies de coníferas (WULLSCHLEGER; MCLAUGHLIN; AYRES, 2004). A resina é rica em terpenos do tipo monoterpenos, diterpenos (abietano e pimarano) e sesquiterpenos. Esse conjunto de metabólitos secundários auxilia na proteção da planta principalmente devido à sua toxicidade sobre patógenos e deterrência (LANGENHEIM, 2003; MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003; WANG et al., 2011).

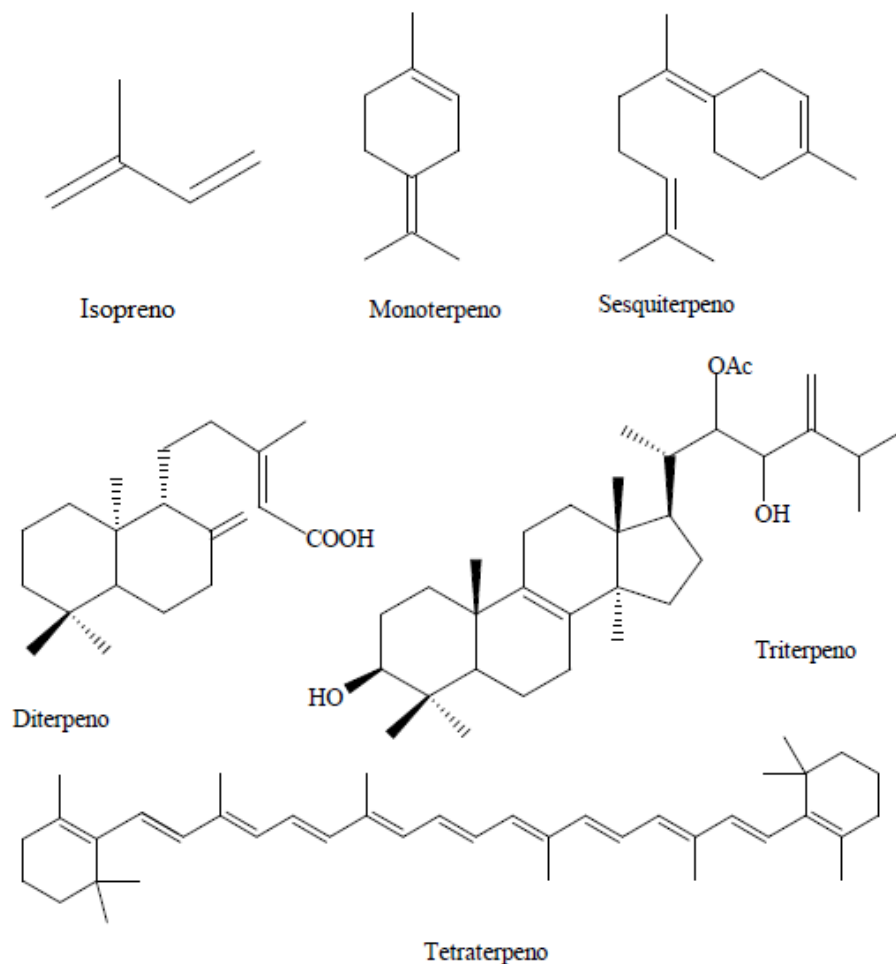
### 1.3 Terpenos

A divisão dos metabólitos secundários pode ser classificada em três categorias: terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos, sendo a classe dos terpenos, ampla e diversificada (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os terpenos são responsáveis pela fragrância característica de muitas plantas, seu

funcionamento primário baseia-se na função quimioatratante (atrativos polinizadores e dispersores de sementes) ou quimiorrepelente (MENDANHA et al., 2012)

Os terpenos são componentes voláteis do óleo essencial, sua estrutura se baseia na fusão repetitiva de unidades ramificadas de cinco átomos de carbonos com base no esqueleto de isopreno (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; LANGENHEIM, 2003; MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003).

O isopreno é um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais, que formam diferentes classes de terpenos: isopreno (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), como representados na figura 3 (MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003).

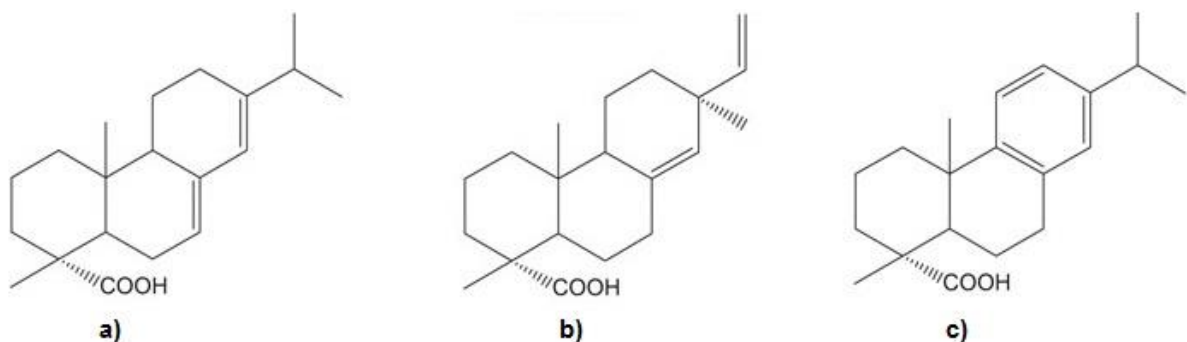


**Figura 3** – Classificações dos terpenos. Fonte: Adaptado de MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, (2003).

### 1.3.1 Diterpenos

Os diterpenóides são múltiplos de quatro unidades isoprênicas (C<sub>20</sub>). Geralmente, são insolúveis em água e apresentam certa volatilidade. Possuem características físico-químicas dependentes da estrutura de sua cadeia orgânica e dos grupos funcionais que os formam (ELSON, 1995). Os diterpenóides tricíclicos presentes nas resinas das coníferas contém o maior grupo de substâncias resinosas, dentre as quais se destacam os ácidos resínicos dos tipos pimárico e abiético (Figura 4). Os diterpenos resínicos destacam-se por apresentar diversas atividades, como: antimicrobiana sobre *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus salivarius* (PORTO et al., 2009; RÍOS; RECIO, 2005); antimalárica contra *Plasmodium falciparum in vitro* (KALAUNI et al., 2006); antitumoral inibindo o crescimento de células cancerosas (MCF-7, SNU-638 e HL-60) (CARRUBA et al., 2006); relaxante vascular do músculo liso bloqueando o influxo de cálcio (AMBROSIO et al., 2006), antifúngica contra leveduras, hifomicetos e dermatófitos (BOECK et al., 2005) e antiparasitária *in vitro* sobre *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (VAHERMO et al., 2015).

O estudo de diterpenos abietanos para produção de novos fármacos está relacionada a sua ampla distribuição no reino vegetal, bem como às suas propriedades biológicas (GONZÁLEZ, 2015).



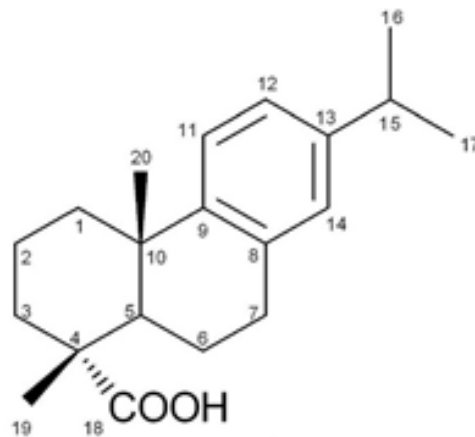
**Figura 4** - Representação dos ácidos resínicos a) ácido abiético, b) ácido pimárico e c) ácido diidroabiético. Fonte: Adaptado de KEELING e BOHLMANN (2006).

### 1.3.2 Estudos Biológicos Realizados com o Ácido Diidroabiético

Um dos ácidos diterpênicos supracitados, o ácido diidroabiético (AD) (Figura

5) é identificado como uma estrutura privilegiada, que juntamente com seus análogos apresentam propriedades biológicas. Em relação a atividade antimicrobiana, o AD tem sido estudado contra diversas espécies de bactérias como: cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Salmonella* sp., *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (GOUIRIC et al., 2004; TAPIA ET. AL, 1997)

Estudos recentes mostraram que o AD apresentou eficácia contra infecções em biofilme bacteriano de *S. aureus*, apresentando capacidade de prevenção à colonização bacteriana e a inibição de biofilmes existentes (FALLARERO et al., 2013).



**Figura 5** – Estrutura do ácido diidroabiético Fonte: O próprio autor.

O AD derivado da resina de *Pinus massonia* apresentou elevada atividade antitumoral *in vivo* em pele de camundongo ICR, inibindo a formação de papiloma, e também atuando como quimiopreventivo (TANAKA; TOKUDA; EZAKI, 2008) na inibição da atividade de células de câncer gástrico, pela ativação da oncos e apoptose (LUO et al., 2016).

O AD mostrou atividade anti-inflamatória pela inibição da formação dos leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), mediadores potente de reações inflamatórias e alérgicas (PFERSCHY-WENZIG et al., 2008). Este composto é também considerado um valioso componente medicinal no tratamento de alterações inflamatórias associadas à diabetes, relacionadas com a obesidade, pela dupla ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR  $\alpha/\gamma$ ) e pela diminuição significativa de mediadores pro-inflamatórios, como proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). (JANG; YANG, 2011).

AD não é capaz de inibir a produção do radical livre óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (KANG et al., 2008).

Foram realizados estudos utilizando o AD sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*, onde demonstrou potentes atividades, com concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC50) de 50 µM para *L. donovani* e de 101,3 µM para *T. cruzi*, o que pode ser considerado um bom ponto de partida para o desenvolvimento de agentes antiprotozoários com elevada seletividade (VAHERMO et al., 2015).

#### 1.4 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são enfermidades infecciosas com caráter endêmico que atingem mais de um bilhão de pessoas nos continentes americano, europeu, africano, asiático e oceânico atingindo principalmente a população mais pobre e vulnerável, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2016). São assim denominadas devido à escassez de investimento governamental, pesquisas, desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, entre outras tecnologias de prevenção e controle (DE SOUZA, 2010).

As DTNs se assemelham devido à associação com falta de higiene e saneamento básico (YAMEY, G; HOTEZ, 2007), sendo ainda hoje um grave problema de saúde pública em todo o mundo, gerando impactos sócio-econômicos negativos além de afetar a qualidade de vida da população mais carente (KEALEY; SMITH, 2015).

##### 1.4.1 Leishmaniose

Leishmanioses são doenças complexas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas ao homem pela picada de insetos hematófagos fêmeas (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo). Após a picada, formas promastigotas metacíclicas (alongadas, flageladas e altamente infectante) são inseridas na derme do hospedeiro, onde são fagocitadas por macrófagos e se alojam no interior dos vacúolos parasitóforos onde diferenciam-se em amastigotas (arredondadas e aflageladas), que são formas intracelulares obrigatórias (BORGHI et al., 2016; VON STEBUT, 2015).

A leishmaniose é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada. Com milhões de pessoas em 98 países do mundo sob o risco de desenvolver uma das formas clínicas da doença (DESJEUX, 2004; REITHINGER et al., 2007).

As principais formas clínicas da doença são: cutânea, mucocutânea e a visceral, nas quais o aspecto clínico e a evolução da doença são dependentes tanto da espécie e virulência do parasito envolvida, quanto da resposta imunológica do hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, podendo se tornar fatal se não tratada. É causada principalmente por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, mas a espécie responsável por essa forma no Brasil é a *Leishmania chagasi*. É caracterizada por febres irregulares, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatias e anemia. Após a recuperação, os pacientes podem desenvolver a forma cutânea, que requer um longo e oneroso tratamento (DESJEUX, 2004).

O acometimento cutâneo nas Américas é conhecido com leishmaniose tegumentar americana (LTA), que é uma zoonose e pode se manifestar três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea mucosa e leishmaniose cutânea difusa. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, caracterizada por lesões múltiplas na pele no formato de úlceras (DESJEUX, 2004).

No novo mundo é causada por espécies do complexo *L. mexicana* como: *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* ou do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) panamensis* (HANDLER et al., 2015).

A leishmaniose mucocutânea é causada por espécies do sub-gênero *Viannia*, especialmente por *L. (V.) braziliensis*. Nesta forma clínica, os parasitos da pele se disseminam via linfática ou sanguínea para mucosas causando destruição total ou parcial das cavidades naso-orofaríngea, podendo trazer prejuízos para o hospedeiro, relacionados a saúde e vida social (DESJEUX, 2004; WHO, 2016). Com relação à leishmaniose cutânea difusa, caracteriza-se por lesões não ulceradas difusas por toda a pele, resultado de metástases do parasito de um sítio para outro. É causada por espécies do complexo *mexicana* cujo agente etiológico no Brasil é *L. amazonensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O Brasil é considerado uma região endêmica para LTA, apresentando altas taxas de notificação da doença em todos os estados (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007). No estado do Paraná, ocorreram notificações em 276 dos 399 municípios, com maior incidência nas regiões norte e oeste, com 528 casos confirmados no ano de 2015 (DATASUS; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Mesmo com o crescente avanço nas pesquisas relacionadas ao parasito e a doença, as medidas de controle, incluindo a atual terapia, não são satisfatórias para o combate à referida zoonose, que continua sendo um grave problema de saúde pública (CROFT; COOMBS, 2003; RICHARD; WERBOVETZ, 2010).

#### 1.4.2 Imunopatogenia na Leishmaniose Tegumentar Americana

Os fatores relacionados com a virulência do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro são determinantes para definir o quadro clínico da doença (LAUNOIS; SWIHART; LOUIS, 1995). Inicialmente, no momento da infecção, os parasitos são identificados pela primeira linha de defesa do organismo constituído por neutrófilos, os quais são responsáveis pela fagocitose de aproximadamente 80 a 90% dos parasitas. Macrófagos, células dendríticas e *natural killers* (NK), são células pertencentes a imunidade inata responsáveis pela produção de quimiocinas, citocinas e moléculas microbidas com o objetivo de eliminar o patógenos e evitar que a infecção se dissemine (EBADI; KARIMI; AMIRGHOFRAN, 2014; PETERS et al., 2009; SCAPINI; LAPINET-VERA; CASSATELLA, 2000).

Estudos em modelos experimentais utilizando camundongos, evidenciaram que a evolução da infecção para cura ou progressão da leishmaniose está relacionada com uma resposta imune mediada por células T (KEDZIERSKI, 2010), sendo esse perfil também observado em humanos (CHOI; KROPF, 2009).

Assim, no desenvolvimento das respostas imunológicas, tanto inata como adaptativa, as citocinas são moléculas essenciais, capazes de intervir no desenvolvimento, ativação e recrutamento de células efetoras, na defesa contra o patógeno e no reparo tecidual (FIDAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014).

Entre as citocinas mais importantes para a resposta imunoprotetora contra *Leishmania* spp. estão as desenvolvidas por linfócitos T auxiliares (Th)-1, como TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , sendo capaz de ativar macrófagos e estimular a síntese espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), moléculas microbidas

fundamentais que auxiliam na eliminação desse parasito (AMOO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; SALAIZA-SUAZO et al., 1999). As citocinas do tipo Th2 como IL-10, IL-6, IL-4 e IL-5, em contrapartida, promovem a progressão da doença (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

Ao entrar no organismo, o patógeno precisa de estratégias de escape, visto que os mecanismos imunológicos são coordenados rapidamente. No entanto, alguns patógenos possuem a capacidade de interferir diretamente na síntese de proteínas do hospedeiro e inibir as respostas inatas (ARGUELLO et al., 2015). A *Leishmania* spp. possui habilidade de regular tanto a resposta imune inata como a adaptativa, inibindo os mecanismos celulares antimicrobianos do hospedeiro através do desequilíbrio da produção, ativação e diferenciação de células Th.

Com essa habilidade de resistir aos mecanismos microbicidas e a localização intracelular do parasito, as medidas de tratamento para a doença mostram falhas terapêuticas, beneficiando a resistência da infecção (HENARD et al., 2014).

#### 1.4.3 Tratamento

Nos últimos 60 anos, os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes como o antimonato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (Figura 6 A e B) (BARRETT; CROFT, 2012). Embora sejam as medicações mais utilizadas, os antimoniais apresentam alta toxicidade, causando reações adversas ao hospedeiro como fadiga, disfunção gastrintestinal, anormalidades no eletrocardiograma, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancreatite e nefrotoxicidade (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Além disso, apresenta dificuldades relacionadas ao tratamento por via parenteral que dificulta a terapêutica, visto que o paciente para ser tratado, necessita comparecer ao hospital ou, em alguns casos, deve ser internado para as aplicações. Os tratamentos na maioria das vezes seguem aplicação diária em ciclos de 28 dias (RATH et al., 2003).

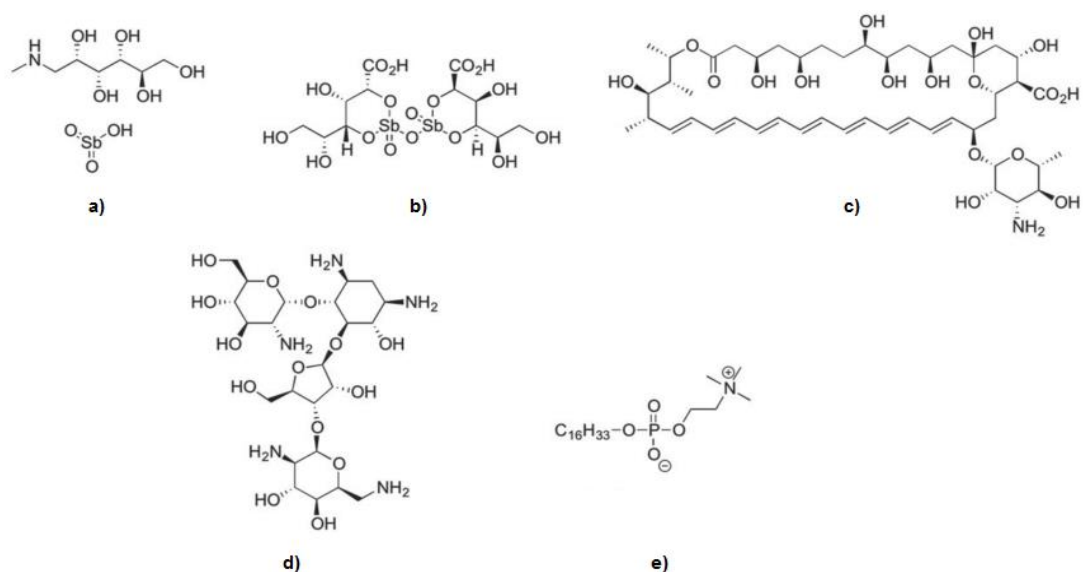
Ainda hoje, os mecanismos de ação do antimônio pentavalente não foram completamente elucidados, porém se acredita que o antimônio pentavalente atue como um pró-fármaco, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração, podendo interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e

glicólise do parasito, levando a uma depleção de ATP intracelular e expondo o parasito ao estresse oxidativo do hospedeiro (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998).

A anfotericina B (Figura 6 C) é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodusus*, que é considerado um fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, sendo empregado como alternativa em regiões onde houve resistência aos antimoniais pentavalentes. Sua utilização provoca reações adversas como inapetência, náuseas, vômitos, dor abdominal, cefaléia e insuficiência renal e sua eficácia não se mostra superior aos fármacos de primeira escolha, limitando a sua utilização (BARRETT; CROFT, 2012; BRAY et al., 2003; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Outros medicamentos como a paramomicina e a miltefosina (Figura 6 D e E) também são medicamentos de segunda escolha, utilizados principalmente no tratamento da leishmaniose visceral. A eficácia desses fármacos pode ser comparada à anfotericina B. Em relação a miltefosina, apesar de sua fácil administração, o abandono do tratamento é muito recorrente devido ao longo período necessário (BARRETT; CROFT, 2012).

Os tratamentos disponíveis para a leishmaniose ainda são um grande desafio devido à sua eficiência limitada e elevada toxicidade, tornando crescente a busca de novos fármacos que apresentem ação leishmanicida mais eficaz e menor toxicidade aos pacientes (GONTIJO; CARVALHO, 2003).



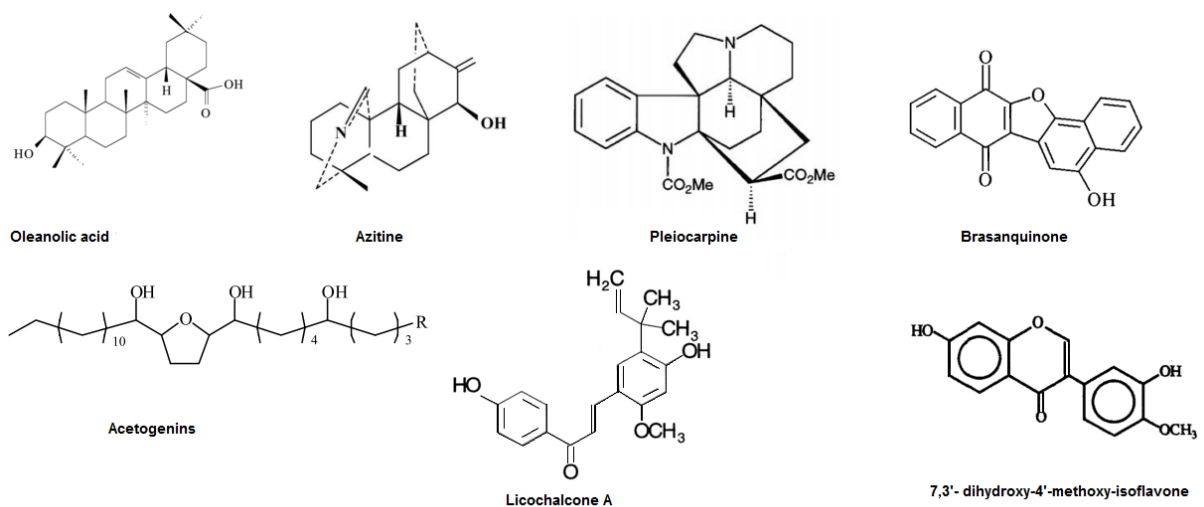
**Figura 6** – Principais fármacos no tratamento da leishmaniose a) *N*-metil glucamina, b) estibogluconato de sódio, c) anfotericina B, d) paramomicina e e) miltefosina.

Fonte: adaptado de GILBERT, (2014).

Neste contexto, o uso de compostos oriundos de fontes naturais pode ser considerada uma alternativa promissora na descoberta de novos tratamentos para a LTA. A atividade de produtos isolados provenientes de plantas, tem sido atribuída aos diversos compostos químicos incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, esteróides e terpenóides, mostrando que a composição química pode potencializar a ação leishmanicida, anti-inflamatória e imunomoduladora para resolver os fenômenos fisiopatológicos dessa doença (ULLAH et al., 2016).

#### 1.4.4 Atividade Leishmanicida dos Produtos Naturais

A comunidade científica tem mostrado avanços no que concerne aos estudos de compostos químicos provenientes do isolamento de extratos vegetais e que apresentam atividade leishmanicida comprovada em formas promastigotas e/ou amastigotas. Destacam-se os triterpenóides (TORRES-SANTOS et al., 2004), diterpenóides (GONZÁLEZ et al., 2005), alcalóides (KAM et al., 1999), naftoquinonas (KAYSER et al., 2000), acetogeninas (GRANDIC et al., 2004), chalconas (CHEN et al., 1993) glicosídeos iridóides (MITTAL et al., 1998), flavonóides (ARAUJO; ALEGRIO; LEON, 1998), fenilpropanóides (BARATA et al., 2000; MAHIOU et al., 1994), óleo essencial (MONZETE et al., 2007) e extrato bruto como o de *Popowia herenthias* (GRANDIC et al., 2004)



**Figura 7** – Compostos químicos com atividade leishmanicida comprovada em formas promastigotas e/ou amastigotas.

Embora a literatura proporcione inúmeros trabalhos neste campo, muitas espécies vegetais com possível atividade leishmanicida carecem de estudo, além disso, pesquisas avaliando mecanismos envolvidos nas atividades leishmanicidas em extratos vegetais requerem atenção.

Em virtude das limitações dos fármacos usuais, a busca de novas substâncias para o desenvolvimento de tratamentos alternativos na leishmaniose é essencial (BARRETT; GILBERT, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Promover o isolamento, purificação e identificação do ácido diidroabiético (AD) proveniente da resina de *Pinus elliottii*, e avaliar *in vitro* o efeito biológico sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e purificar o ácido diidroabiético proveniente da resina por métodos cromatográficos;
- Realizar a elucidação estrutural do ácido diidroabiético;
- Efetuar o estudo *in silico* pelas regras de Lipinski;
- Avaliar a atividade leishmanicida direta;
- Verificar as alterações morfológicas causadas pelo tratamento nas formas promastigotas;
- Estabelecer os mecanismos de morte envolvidos durante a ação direta do AD sobre as formas promastigotas;
- Determinar a citotoxicidade exercida pelo composto em macrófagos murinos e eritrócitos humanos tratados com AD;
- Identificar a atividade leishmanicida em formas amastigotas ou intramacrofágico;
- Verificar se o ácido diidroabiético é capaz de induzir a produção de citocinas (de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) por macrófagos infectados ou não após 24 horas de tratamento
- Avaliar a produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e espécies reativas de oxigênio em macrófagos infectados e tratados com AD.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção da resina

O Ácido diidroabiético (AD) utilizado nesse trabalho foi obtido a partir da oleoresina certificada de *Pinus elliottii* var. *Elliotti*, que foi gentilmente cedida pela ARESB - Associação dos Resinadores do Brasil, localizada na cidade de Avaré – São Paulo.

#### 3.2 Preparo da oleoresina e isolamento do composto majoritário

A resina de *Pinus elliottii* (14g) foi solubilizada com diclorometano e incorporada a uma pequena porção de sílica, sendo totalmente seca em estufa de ar circulante, obtendo-se uma pastilha dessa resina. A coluna líquida a vácuo (CLV) empacotada com sílica 60H (Merk- Cod: 1.07736.1000), foi adicionada a pastilha da resina e a mesma foi eluída com Hexano:Acetato de etila (Hex:AcOEt) nas proporções de 100% Hexano, 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, 1:1, 3:7, 100% acetato de etila e 100% metanol, até o esgotamento total do material vegetal.

Após a CLV as frações foram secas a temperatura ambiente até a total eliminação dos solventes. Foi realizado o monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) e as frações similares foram combinadas, obtendo-se nove frações principais, que foram designadas conforme a Tabela 1.

Posteriormente, observou-se a presença de um composto majoritário, além da formação de cristais nesta mesma fração (Fração 03). Deste modo, essa fração foi submetida ao processo de lavagem por solvente com metanol gelado, deixando-se a fração em baixa temperatura (4°C) por 24 horas após três dias. Este procedimento foi realizado até que o metanol e os cristais se tornassem límpidos.

#### 3.3 Identificação do composto majoritário

Os cristais obtidos a partir do processo de lavagem por solvente gelado foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Avance Modelo III, utilizando experimentos de 1D e 2D operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e a 100,61 MHz para  $^{13}\text{C}$  utilizando uma sonda de banda larga de 5

mm, foram registrados utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e os resultados foram analisados com base nos dados da literatura.

O ponto de fusão (pf) foi determinado em aparelho de placa quente marca Microquímica MQAPF 302.

A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas foi realizada através do equipamento UPLC® I-Class, *Acquity*, *Waters* utilizando coluna *Phenomenex Luna C18* (2,50 mm x 4,60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) com eluição por gradiente utilizando água ultrapura e acetonitrila grau massas (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA) para análise no modo negativo. Os dados foram adquiridos pelo *software* MassLynx v.4.1 O volume injetado foi de 20  $\mu\text{L}$  sendo solubilizado em acetonitrila e diluído em água ultrapura na concentração de 100 mg/L. A temperatura da coluna foi de 30°C, o tempo de retenção foi de 22,07 e o processo analítico durou 25 minutos.

Para a confirmação da identidade da amostra se empregou um detector *Acquity* do tipo *Tandem Quadrupole Detector* (TQD), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo. A temperatura da fonte ESI foi de 120°C. As condições do espectro de massas foram: Tensão da fonte 3,5 kV, temperatura do gás de dessolvatação da fonte 500°C a uma vazão de 900 L h<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>; a voltagem do cone extrator foi de 2V a um fluxo de 20 L h<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>. Os dados foram coletados e analisados pelo *software* Masslynx 4.1 desenvolvida pela Waters. Foram monitoradas massas de 140 à 800 *m/z*

### 3.4 Estudo *in silico* do ácido diidroabiético

Para o estudo *in silico*, a estrutura do ácido diidroabiético foi desenhada no software gratuito *online* para cálculo de propriedades Molinspiration ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)), onde são realizados cálculos de parâmetros relacionados a biodisponibilidade oral de acordo com a Regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2004), permitindo a análise da porcentagem teórica de absorção oral do composto através da superfície polar topológica (TPSA) pela equação:

$$\%ABS = 109 - (0,345 \times TPSA)$$

Essa análise verifica a capacidade de uma molécula em ser um bom fármaco de acordo com quatro parâmetros múltiplos de cinco: Lipofilicidade ( $\geq 5$ ),

massa molecular ( $\leq 500$ ), aceptores de ligação de hidrogênio ( $\leq 10$ ) e doadores de ligação de hidrogênio ( $\leq 5$ ). A molécula pode apresentar apenas uma violação a um desses parâmetros para ser candidato a fármaco (LIPINSKI, 2004).

### **3.5 Manutenção das formas promastigotas de *L. amazonensis***

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO), provenientes da Universidade Estadual de Maringá foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO, Invitrogen, New York, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO – Invitrogen, New York, USA), 10 mM tampão HEPES, 0.1% urina humana, 0.1% L-glutamina, 10 U/mL estreptomicina e 10  $\mu$ g/mL penicilina (GIBCO, Invitrogen) e 10% de bicarbonato de sódio com pH do meio em 7,4. O cultivo celular foi mantido em estufa do tipo B.O.D à 25°C, em frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Foram usados em todos os experimentos, formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (quinto dia de cultura).

### **3.6 Animais Experimentais e Comitê de Ética Animal**

Foram utilizados camundongos BALB/c pesando aproximadamente 25-30g com idade entre 6–12 semanas obtidos do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Curitiba, Brasil. Os camundongos foram mantidos no Biotério do departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, com temperatura (em torno de 22 $\pm$ 2°C) e luminosidade controlada seguindo o ciclo claro/escuro (12/12 h). Mantidos em caixa de polietileno com livre acesso a água estéril e ração comercial, *ad libitum* autoclavada sobre condições estéreis, utilizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de ética para o uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (Número do protocolo 6955/2016.59 – Apêndice C).

### **3.7 Atividade leishmanicida do ácido diidroabiético sobre formas promastigotas**

As culturas das formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações do AD (15, 25, 50, 75, 100, 125  $\mu$ g/mL) que foram pré-determinadas de acordo com dados da literatura (RUBIO et al., 2005).

As formas promastigotas foram contadas em uma câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Como controle negativo foram utilizadas promastigotas mantidas em meio de cultura 199 sem tratamento, e como controle positivo, formas promastigotas foram tratadas com Anfotericina B 1 $\mu$ M.

### **3.8 Análise morfológica de promastigotas por Microscopia Eletrônica de Varredura**

A análise da morfologia de formas promastigotas foi realizada de acordo com Da Silva e colaboradores (2013). Formas promastigotas do parasito foram tratadas com 40  $\mu$ g/mL de AD a 25°C por 24 horas. Após o tempo de incubação com o tratamento, os parasitos foram coletados, lavados com PBS e fixados com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo 1mM de CaCl<sub>2</sub>. Após a fixação, as amostras foram colocadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina. Em seguida as amostras foram desidratadas com banhos graduais de etanol, ponto crítico seco em CO<sub>2</sub> (Bal-Tec SCD 050), revestido com ouro e foram observados em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

### **3.9 Determinação da Exposição de Fosfatidilserina**

A exposição de fosfatidilserina foi detectada utilizando Anexina-V FITC (Invitrogen, Eugene, EUA), uma proteína de ligação de fosfolípido dependente de cálcio usado como um marcador de apoptose. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1 $\times$ 10<sup>6</sup> células/mL) foram tratadas com 40  $\mu$ g/mL de AD ou somente meio 199 (controle) por 24 h à 25°C. Depois disso, os parasitos foram lavados e ressuspensos em 100  $\mu$ L de tampão de ligação (140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> e 10 mM HEPES-Na, em pH 7,4), seguido pela adição de 5  $\mu$ L da Anexina V FITC durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 400  $\mu$ L de tampão de ligação. A obtenção dos dados foi realizada utilizando um leitor de fluorescência de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finland) a um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 520 nm. A fim de comparar o tratamento com o controle, os valores obtidos da fluorescência foram normalizados para o respectivo número de células.

### **3.10 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em formas promastigotas**

Com objetivo de avaliar a produção de EROs por *L. amazonensis*, formas promastigotas ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram tratadas com 40 µg/mL de AD ou somente meio 199 (controle) por 24 horas, em seguida os parasitos foram lavadas com PBS (pH 7.4) e incubados com 10 µM da sonda diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) diluídas em DMSO e incubadas no escuro por 45 minutos à 25°C. As espécies reativas de oxigênio foram mensuradas como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante diacetato 2',7'-diclorofluoresceína não fluorescente para o altamente fluorescente 20,70-diclorofluoresceína, com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

### **3.11 Determinação da integridade da membrana celular**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram tratadas com 40 µg/mL (IC<sub>50</sub>) de AD ou somente meio 199 (controle) por 24h à 25°C, em seguida coletadas, lavadas com PBS e incubadas diretamente com iodeto de propídio (IP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0,50 µg/mL) durante 5 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos parasitos foi realizada imediatamente utilizando um leitor de fluorescência de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finland) com excitação de 480 nm e comprimento de onda de emissão de 580 nm. Os valores da fluorescência foram normalizados para o número total de células de cada tratamento.

### **3.12 Efeito citotóxico em macrófagos peritoneais**

Os efeitos citotóxicos do AD em macrófagos peritoneais foram testadas com base na oxidação mitocondrial por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como ensaio descrito por MOSMANN, (1983).

Os macrófagos ( $5 \times 10^5$  célula/mL) foram recuperados a partir da cavidade

peritoneal de camundongos BALB/c com PBS gelado suplementado com 3% de SBF e, em seguida, cultivados em placas de 24 poços com 500 µL de meio RPMI 1640 (10% de SBF) durante 24 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). As células aderentes foram incubadas com AD (40, 50, 75 e 100 µg/mL) e cultivadas durante 24 h, sob as mesmas condições.

Após este período, a cultura foi lavada com PBS e adicionado MTT (5 mg/mL) aos poços, seguido de outra incubação por um período de quatro horas. O produto MTT (cristais de formazan) foi diluído com 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi realizada com um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) à 550 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao grupo de controle calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = (amostras tratadas com AD / amostra não tratada) x 100.

### **3.13 Análise da atividade hemolítica**

A fim de avaliar a toxicidade do composto em hemácias de indivíduos saudáveis, realizamos o teste de ensaio hemolítico, que é uma análise importante para determinar se os tratamentos podem causar efeitos adversos, como anemia. Para isso, foram coletados sangue de indivíduos saudáveis com tubo à vácuo heparinizado, e os eritrócitos foram lavados por três vezes com PBS (centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos). Foi preparada uma suspensão de hemácias 2% com PBS. O tratamento nas concentrações de 40, 50, 75 e 100 µg/mL de AD foi incubado 1:1 em um volume total de 200 µL, com a suspensão de 2% de hemácias em placa de 96 poços por 3 horas a 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle negativo foi utilizado PBS e como controle positivo água destilada para hemólise. As placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e analisados pela leitura da absorbância a 550 nm. Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

### **3.14 Ensaio leishmanicida em formas amastigotas**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram

distribuídos em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500µL de meio RPMI 1640 por 24 horas em estufa B.O.D à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para aderência dos macrófagos. Após o período de aderência, o sobrenadante foi retirado e armazenado para dosagem de citocinas e NO. As células fagocíticas que permaneceram nas lamínulas foram infectadas com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Para isso as formas promastigotas foram centrifugadas a 2000 rpm por 7 minutos e ressuspensas em meio 199 para a contagem em câmara de Neubauer, para ajuste da concentração. Foram adicionadas 2,5x10<sup>6</sup> promastigotas/poço, mantidas por 2 horas em B.O.D com 5% de CO<sub>2</sub> nas mesmas condições descritas acima, a fim de ocorrer fagocitose. Após a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderentes foram tratadas com AD (40, 50 e 75 µg/mL), meio RPMI 1640 (controle) ou Anfotericina B (AmB) 1µM por 24 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após esse período de tratamento, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e NO. As lamínulas contendo as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (Laborclin, Pines-PR Brazil), depois de secas foram coladas em lâminas com entelan (Merck) e analisados 20 campos por microscopia óptica em aumento com ampliação de 1000x (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para avaliar o índice fagocítico e o número de amastigotas por macrófagos.

### **3.15 Teste de recuperação de promastigotas**

O ensaio de recuperação de formas promastigotas foi realizado como descrito por Da Silva e colaboradores (2013). Brevemente, os macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* tratados com concentrações de AD nas mesmas condições descritas no protocolo do ensaio leishmanicida em formas amastigotas. Após 24 horas de tratamento, a cultura celular foi lavada com PBS e incubadas com meio de cultura 199 e a placa incubada em estufa B.O.D a 25 °C por 120 horas, a fim de induzir a diferenciação de amastigotas intracelulares em formas promastigotas. Promastigotas recuperadas foram contadas em câmara de Neubauer durante cinco dias consecutivos, para avaliar a saída das formas promastigotas dos macrófagos.

### **3.16 Determinação dos níveis de citocinas**

Os sobrenadantes coletados do ensaio leishmanicida em formas amastigotas foram utilizados para dosagem de citocinas através da técnica do ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) usando de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience®, EUA). A concentração de citocinas foi determinada com referência na curva padrão por seriadas diluições, e a absorbância ótica mensurada a 450 nm através de um leitor de placas ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO). O perfil de citocinas foi analisado antes e após a infecção com o parasito. Foram avaliados os níveis de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) -6, IL-12 e IL-1 $\beta$ .

### **3.17 Determinação dos níveis de nitrito como estimativa dos níveis de NO**

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess. Alíquotas do presente no sobrenadante das amostras do ensaio leishmanicida em formas amastigota (item 3.14) foi medido como estimativa dos níveis de óxido nítrico (NO). Alíquotas de 60  $\mu$ L foram desproteinizadas com 50  $\mu$ L de ZnSO<sub>4</sub>, 75 mM e centrifugadas a 9500 g por dois minutos. Em seguida, foram adicionados 70  $\mu$ L de NaOH 55mM (Merck) e a amostra foi centrifugada novamente a 9500 rpm por cinco minutos à 25°C. O sobrenadante foi recuperado e diluído em tampão glicina (45g/L pH 9.7, Merck) na proporção de 1:5. Grânulos de cádmio (Fluka) foram previamente ativados em CuSO<sub>4</sub> 5mM em glicina-NaOH (15 g/L, pH 9.7, Merck) por cinco minutos e, em seguida, foram adicionados ao sobrenadante diluído da amostra para incubação por 10 minutos. Nesta etapa, ocorreu a conversão de todo nitrato presente na amostra em nitrito. Para detecção dos níveis de nitrito, foi adicionado o reagente de Griess (Reagente I: 50 mg de N-naphthylethylenediamine em 250 mL de água destilada; Reagente II: 5 g de ácido sulfanílico em 500 mL de HCl 3M, Sigma). A concentração de nitrito das amostras foi obtida a partir da leitura das absorbâncias das amostras e curva padrão de nitrito a 550 nm em leitor de microplaca.

### **3.18 Determinação de EROs em macrófagos peritoneais**

A produção de EROs em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram lavados com PBS (pH 7,4) e incubados com 10  $\mu$ M da sonda diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) diluídas em DMSO e incubadas no escuro por 30 minutos, 37°C, 5° CO<sub>2</sub>. O antioxidante N-acetilcisteína (NAC) foi utilizado para inibir EROs. As espécies reativas de oxigênio foram mensuradas pelo aumento na fluorescência causada pela conversão de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína não fluorescente para o altamente fluorescente 20-70-diclorofluoresceína, com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

### **3.19 Análise estatística**

Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500,288). Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. p-valor  $\leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Preparo da oleoresina, isolamento e elucidação estrutural do composto majoritário

*Pinus elliottii* foi selecionado visando o isolamento do ácido diidroabiético (AD) a partir de sua resina. Desta forma, foi realizado o fracionamento da resina que resultou em nove frações e os rendimentos foram demonstrados na Tabela 1.

A fração de número três se destacou por ser a única a apresentar a formações de cristais com um rendimento de 24,89% do composto isolado.

**Tabela 1** - Frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo do diterpeno *Pinus elliottii* em gradiente crescente de polaridade e rendimentos obtidos das frações (g).

Fração	Proporção solvente (%)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
1	Hexano 100	1,215	8,68
2	Hexano:Acetato de etila 9:1	0,509	3,63
3	Hexano:Acetato de etila 4:1	3,485	24,89
4	Hexano:Acetato de etila 7:3	2,742	19,58
5	Hexano:Acetato de etila 3:2	1,067	7,62
6	Hexano:Acetato de etila 1:1	0,947	6,76
7	Hexano:Acetato de etila 3:7	0,861	6,15
8	Acetato de etila 100	0,726	5,18
9	Metanol 100	0,512	3,66

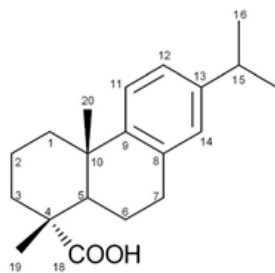
A fração três foi caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice A – figura 14) onde foi possível verificar a presença dos sinais:  $\text{H}_{11}$  em  $\delta$  7,19,  $\text{H}_{12}$   $\delta$  7,01 e  $\text{H}_{14}$   $\delta$  6,90 ppm referentes ao anel aromático. Os hidrogênios alifáticos  $\text{H}_1$  a  $\text{H}_7$  na região de  $\delta$  1,49 a 2,99 ppm, referentes aos dois anéis saturados, os sinais dos hidrogênios metílicos,  $\text{H}_{16}$  e  $\text{H}_{17}$  em  $\delta$  1,24 e  $\text{H}_{19}$   $\delta$  1,30 ppm, além do hidrogênio  $\text{H}_{15}$  proveniente da cadeia lateral alifática em  $\delta$  2,84 ppm observado como um hepteto com  $J = 6,83$  Hz. Os sinais dos hidrogênios metílicos referente ao  $\text{H}_{20}$  foram observados no espectro de  $^1\text{H}$  na região  $\delta$  1,23 ppm, porém com sobreposição parcial com os  $\text{H}_{16}$  e

H<sub>17</sub>. A correlação do H<sub>20</sub> com o C<sub>20</sub> foi determinada por HSQC (Apêndice A - figura 22 a 25).

Realizou-se a caracterização por RMN de <sup>13</sup>C (Apêndice A – figura 15) onde foi possível observar a presença do sinal do C<sub>18</sub> em δ 184,41 ppm referente à carbonila, dos carbonos C<sub>8</sub> e C<sub>9</sub> em δ 134,69 e 146,75 ppm respectivamente, C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub> entre δ 123,88 a 145,73 ppm referentes ao anel aromático, e os sinais dos carbonos C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> entre δ 18,72 a 134,69 ppm, característicos aos dois anéis saturados, além dos carbonos metílicos C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub> e C<sub>20</sub> entre δ 16,20 e 25,12 ppm. Todos os sinais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C obtidos foram comparados com os dados relatados por VAN BEEK et al., (2007) conforme Tabela 2 e 3, identificando um diterpeno da classe dos abietanos conhecido como ácido diidroabiético.

**Tabela 2** - Dados de RMN de <sup>1</sup>H (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

H	Van Beek (2007)	AD
	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm), I, m, J (Hz)
1α	1,51	1,49 – 1,59 (1H, m)
1β	2,31	2,32 (1H, d, J= 12,59)
2α	1,75	1,71-1,94 (5H, m)
2β	1,80	1,71-1,94 (5H, m)
3α	1,80	1,71-1,94 (5H, m)
3β	1,71	1,71-1,94 (5H, m)
5	2,24	2,26 ( 1H, dd, J= 12,36; 1,59)
6α	1,55	1,49 – 1,59 (1H, m)
6β	1,86	1,71-1,94 (5H, m)
7α	2,93	2,90-2,99 (1H, m)
7β	2,88	2,90-2,99 (1H, m)
11	7,18	7,19 (1H, d, J= 8,18)
12	7,00	7,01 (1H, dd, J= 8,03; 1,22)
14	6,89	6,90 (1H, s)
15	2,83	2,84 (1H, st, J= 6,83)
16	1,23	1,24 (9H, d, J= 6,81)
17	1,23	1,24 (9H, d, J= 6,81)
19	1,29	1,30 (3H, s)
20	1,22	1,23 (9H, s)



**Tabela 3** - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

C	Van Beek (2007) $\delta_{\text{C}}$ (ppm)	AD $\delta_{\text{C}}$ (ppm)	C	Van Beek (2007) $\delta_{\text{C}}$ (ppm)	AD $\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	37,90	37,90	11	124,2	124,11
2	18,50	18,72	12	123,9	123,88
3	36,70	36,71	13	145,8	145,73
4	47,50	47,39	14	126,9	126,9
5	44,60	44,60	15	33,50	33,45
6	21,80	21,75	16	24,00	23,97
7	30,00	29,99	17	24,00	23,97
8	134,7	134,69	18	185,4	184,41
9	146,8	146,75	19	16,20	16,23
10	36,90	36,86	20	25,20	25,12

A determinação do ponto de fusão é uma análise termofísica, simples e confiável de pureza da amostra (DIAS et al., 2014). O composto isolado apresentou ponto de fusão de 157 – 160° C de acordo com o apresentado por Pajari (1942).

A identificação realizada por UPLC-MS/MS, conforme ilustrado na figura 26 e 27, apresentou um espectro definido no comprimento de onda de 210 nm no tempo de retenção de 22,072 minutos. O espectro de massas foi efetuado no modo negativo, apresentando pico do íon molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , confirmando o ácido diidroabiético ( $m/z = 299,41$ ) (apêndice B), sendo compatível com os dados apresentados por SU e colaboradores (2011).

#### 4.2 Estudo *in silico* do ácido diidroabiético

Em relação ao estudo *in silico*, o ácido diidroabiético apresentou uma única violação aos valores teóricos às regras de Lipinski (Tabela 4), sendo o valor da lipofilicidade (Milog P) acima de 5,0 porém os outros parâmetros como a massa molecular, grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH) e o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) encontram se dentro dos estabelecidos por Lipinski.

A regra também denominada regra dos cinco, tem por objetivo estimar parâmetros de compostos, predizendo a influência de sua estrutura química na absorção de um composto via oral, sendo esses parâmetros farmacocinéticos determinados no início de uma pesquisa é de extrema importância para o

desenvolvimento de um candidato a fármaco (KELLER; PICHOTA; YIN, 2006; LIPINSKI, 2004).

O valor da área de superfície polar (ASP) também se encontra dentro dos parâmetros (37,30 Å<sup>2</sup>) o que indica que teoricamente o composto possui uma boa permeabilidade na membrana plasmática celular com 96,13% de absorção (Tabela 4). De acordo com Gilbert (2014), os fármacos Glucantime® e Anfotericina B utilizados no tratamento de infecções por espécies de *Leishmania*, não obedecem todos os parâmetros determinados pela regra de Lipinski.

Peng e Roberts (2000) destacaram o ácido diidroabiético como o mais hidrofílico e solúvel em água (5,11 mg/L) dentre os ácidos resínicos, sendo a solubilidade dependente da estrutura (NYREN; BACK, 1958).

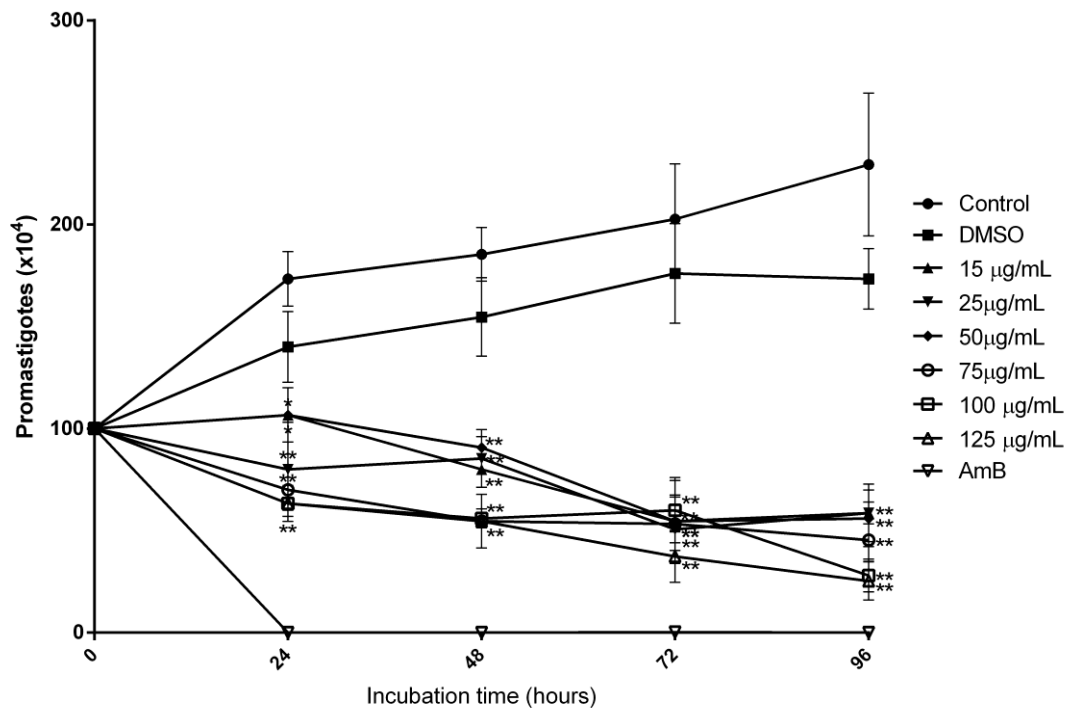
**Tabela 4** – Regras de Lipinski realizada para o ácido diidroabiético

Ácido Diidroabiético (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )						
Regra de Lipinski						
ABS %	ASP	MM (g.mol <sup>-1</sup> ) (≤500)	Millog P (≤5)	nALH (≤10)	nDLH (≤5)	N° Violações
96,13	37,30	300,44	5,67	2	1	1

#### 4.3 Atividade Leishmanicida do AD sobre formas promastigotas

Após a identificação do composto, foi analisado o efeito do AD na proliferação de *L. amazonensis*. Para isso, formas promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações do composto (15, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL), por 24, 48, 72 e 96 horas. As concentrações iniciais foram baseadas de acordo com o trabalho de Rubio e colaboradores (2005).

O tratamento dos parasitos com todas as concentrações nos tempos testados foi capaz de inibir a proliferação das formas promastigotas, sendo que no tempo de 24 horas houve uma redução de 38,5; 53,8; 38,5; 40,4; 36,5 e 36,5% respectivamente, não havendo diferença significativa entre os tempos testados (Figura 8). Desta forma, o período de 24 horas foi eleito para prosseguir com os ensaios. O IC<sub>50</sub> determinado para o AD sobre formas promastigotas foi de 40 µg/mL, equivalente à 0,133µM, sendo portanto, esta concentração utilizada nos próximos ensaios.



**Figura 8** – Atividade leishmanicida do ácido diidroabiético sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Concentrações utilizadas do AD (15, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/mL) e avaliação da viabilidade dos parasitas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Anfotericina B (AmB) foi utilizada como controle positivo e DMSO (0,1%), como diluente do AD. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente comparado ao grupo controle ( $p \leq 0.05$ ) \*\* ( $p \leq 0.0001$ ).

Vahermo e colaboradores, (2015) já haviam verificado o potencial leishmanicida do AD comercial (Pfaltz & Bauer, USA), apresentando atividade direta sobre formas amastigotas axênicas de *L. donovani* com redução de 91.1 % e 59.2 % no crescimento dos parasitos, nas concentrações de 50 µM e 15 µM, respectivamente.

#### 4.4 Análise morfológica de promastigotas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após verificar a capacidade inibitória direta exercida pelo composto na proliferação dos parasitos, foi analisada sua capacidade de provocar alterações morfológicas nas formas promastigotas. Para isso, foi realizada a MEV que

apresentou sinais de encolhimento, superfície enrugada e flagelos com alterações no comprimento (Figura 9B e C), diferentemente, dos parasitos não tratados que apresentaram forma alongada e flagelo longo, característico de parasitos viáveis (Figura 9A).



**Figura 9** – Microscopia eletrônica de varredura mostrando alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24h de tratamento com 40µg/mL de ácido diidroabiético. A) Morfologia característica do parasito viável (Controle); B-C) formas promastigotas tratadas com 40µg/mL de AD apresentando sinais de encolhimento, superfície enrugada e flagelos com alterações no comprimento.

Até o momento não foi observado na literatura, alterações morfológicas induzidas por diterpenos abietano em microrganismos, porém as alterações observadas foram semelhantes às encontradas no tratamento de formas promastigotas de *L. donovani* com diterpeno tipo clerodano (KATHURIA et al., 2014), demonstrando que alguns diterpenos interferem na morfologia de espécies de *Leishmania*.

#### **4.5 Mecanismos de Morte envolvidos no tratamento com AD sobre formas promastigotas**

Não há dados na literatura que demonstrem quais são os mecanismos envolvidos na morte das formas promastigotas de *L. amazonensis* desencadeados por este composto. Para elucidar esses mecanismos, foi investigada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), exposição de fosfatidilserina e perda de integridade de membrana plasmática (Figura 7).

Sabe-se que as células podem sofrer danos reversíveis e/ou irreversíveis e este último leva à morte celular, que ocorre por duas principais vias: a apoptose e a

necrose. A apoptose, caracterizada pela marcação positiva de Anexina V, é considerada uma morte celular programada, que apresenta alterações morfológicas e moleculares características como encolhimento das células, condensação da cromatina, fragmentação de DNA e externalização da fosfatidilserina (ARAMBAGE et al., 2009; DUSZENKO et al., 2006). Apesar de não haver trabalhos demonstrando apoptose de promastigotas causada pelo tratamento com AD, alguns autores mostraram que análogos provenientes do AD são capazes de induzir apoptose em células de câncer gástrico e células HeLa (HUANG et al., 2015; LUO et al., 2016).

Complementando estes dados, os resultados obtidos mostraram que promastigotas tratadas com 40 µg/mL de AD tiveram aumento na exposição de fosfatidilserina quando comparadas com o controle (Figura 10A).

Um dos eventos desencadeantes da apoptose em tripanossomatídeos é a produção de EROs, resultantes da alteração do potencial de membrana mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011). EROs podem ser geradas em resposta a alguns fármacos, induzindo a morte do parasito (FONSECA-SILVA et al., 2011). Diante do exposto, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio total nas formas promastigotas tratadas com AD (MYHRE et al., 2003).

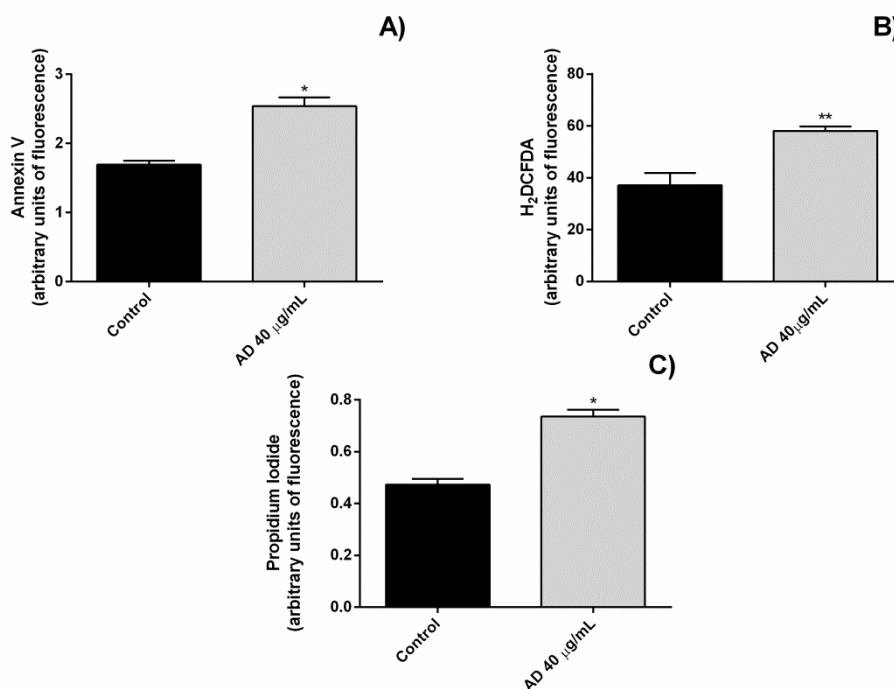
Com isso, foi possível observar aumento na produção de EROs quando comparado com o grupo controle (Figura 10B).

Devido sua única mitocôndria, os parasitos do gênero *Leishmania* necessitam da manutenção do potencial transmembrana mitocondrial para a sua sobrevivência (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999), quando ocorre disfunções mitocondriais os níveis de EROs são elevados podendo induzir morte do parasito. Do mesmo modo, Kathuria e colaboradores (2014) evidenciaram níveis elevados de EROs em formas promastigotas de *L. donovani* tratadas com 25 e 50 µM do diterpeno tipo clerodano 16α-hidroxicleroda-3,13(14)Z-dien-15,16-olide isolado do extrato de *Polyalthia longifolia*.

Outro tipo de morte celular é a necrose, onde ocorre a tumefação intensa, ruptura celular, desnaturação, coagulação proteica e degradação de organelas (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). Este tipo de morte é caracterizado pela perda da integridade da membrana plasmática, que pode ser visualizada pela marcação com iodeto de propídio (IP), que se difunde através de membranas rompidas e se ligam a ácidos nucleicos (BOUCHIER-HAYES et al., 2008). De acordo com a Figura 10C,

formas promastigotas tratadas com AD também tiveram aumento da marcação com IP, diferindo em relação ao controle ( $p \leq 0.05$ ).

Um terceiro padrão de morte celular é a apoptose tardia, confirmada por dupla marcação de Anexina V e IP (DUTTA et al., 2007; SAHA et al., 2009). Com estes resultados pode-se inferir que possivelmente o tratamento está induzindo a morte das formas promastigotas por um evento de apoptose tardia sinalizada pela marcação de Anexina V e IP, ocasionado pelo aumento da produção de EROs, podendo estar relacionado a um desequilíbrio mitocondrial (ISLAMUDDIN; SAHAL; AFRIN, 2013; MEHTA; SHAHA, 2004; PARIS; LOISEAU; BORIES, 2004).

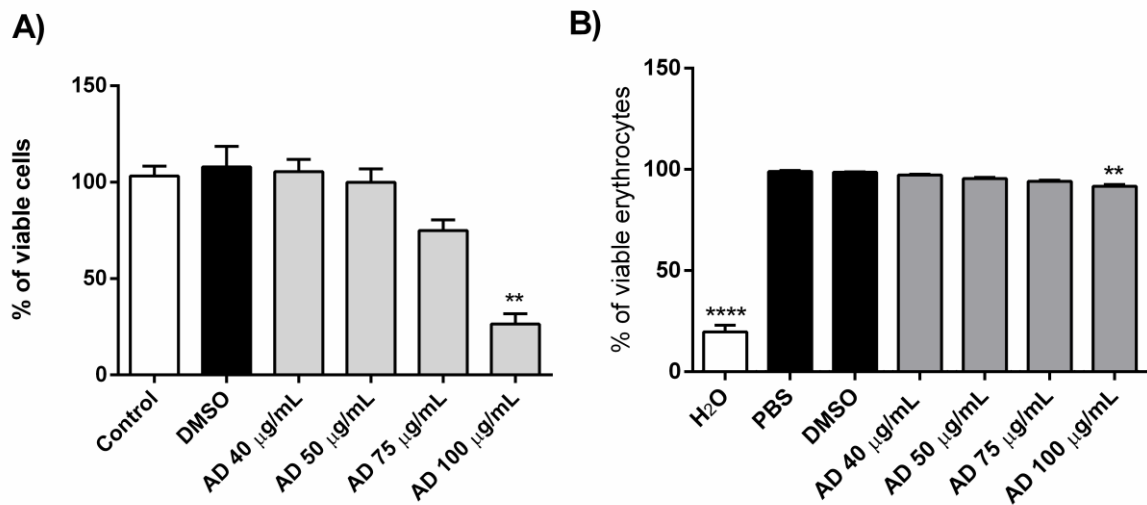


**Figura 10** – Mecanismo de morte induzido pelo ácido diidroabiético em formas promastigotas de *L. amazonensis*. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 40µg/mL de AD durante 24 horas, como controle foram utilizados apenas promastigotas e meio 199. Foram avaliadas a exposição da fosfatidilserina por marcação com Anexina V, (A), a produção das espécies reativas de oxigênio através da sonda H<sub>2</sub>DCFDA (B) e análise da integridade da membrana plasmática pela coloração com iodeto de propídio, (C) . Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferença significativa em relação ao controle \* ( $p \leq 0.05$ ) \*\* ( $p \leq 0.01$ ).

#### 4.6 Efeito citotóxico em macrófagos peritoneais e eritrócitos humanos

Sendo as formas amastigotas parasitos intracelulares obrigatórios, um fármaco ou composto desejável para o tratamento da leishmaniose deve apresentar características que permitam eliminar o parasito sem comprometer o hospedeiro.

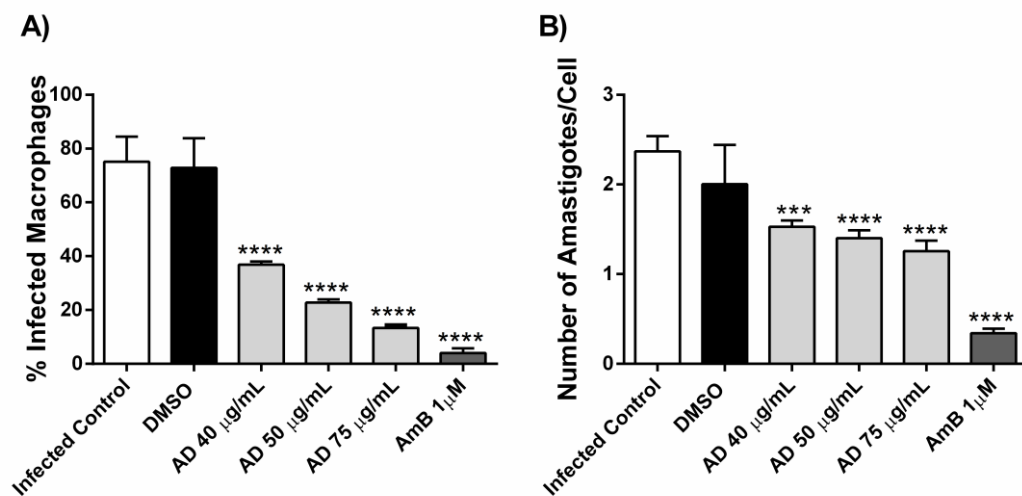
Sendo assim, com o intuito de avaliar se o AD causaria algum dano celular, foi realizado o teste de viabilidade celular por MTT em macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos humanos. Constatamos que as somente a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foi tóxica para as células após 24 horas de tratamento (Figura 11). Desta forma, o presente estudo complementa o descrito na literatura, que comprovaram que diterpenos isolados da oleoresina *Copaifera* spp. não exibiram atividade hemolítica (VARGAS et al., 2015).



**Figura 11** – Citotoxicidade do ácido diidroabiético. A) Macrófagos peritoneais tratados com AD nas concentrações de 40, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  no período de 24 horas sendo a viabilidade determinada por teste de MTT. B) eritrócitos humanos tratados com AD nas concentrações de 40, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  no período de 3 horas verificando a % de eritrócitos viáveis. Control (macrófagos + meio RPMI), PBS (hemácias + PBS) e DMSO a 0,1% (Diluíte do AD) foram utilizado como controle negativo e H<sub>2</sub>O como controle positivo para hemólise. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*\* ( $p \leq 0.01$ ) em relação ao grupo controle.

#### 4.7 Ensaio Leishmanicida sobre formas amastigotas

Sabendo que formas amastigotas são mais resistentes à ação de agentes microbicidas e fármacos quando comparados à forma promastigotas (CUNNINGHAM, 2002), e que AD não promove citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais, foi avaliado o efeito de concentrações não citotóxicas (40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$ ) do composto sobre formas amastigotas internalizadas. Neste estudo foi determinada a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago após 24 horas de tratamento. Observou-se que houve uma diminuição nos macrófagos infectados de maneira concentração dependente, reduzindo 38,3; 52,4 e 61,8% quando tratados com as concentrações de 40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 12A). Além disso, redução no número de amastigotas por macrófagos nas mesmas concentrações descritas, quando comparado com o controle não tratado (Figura 12B).

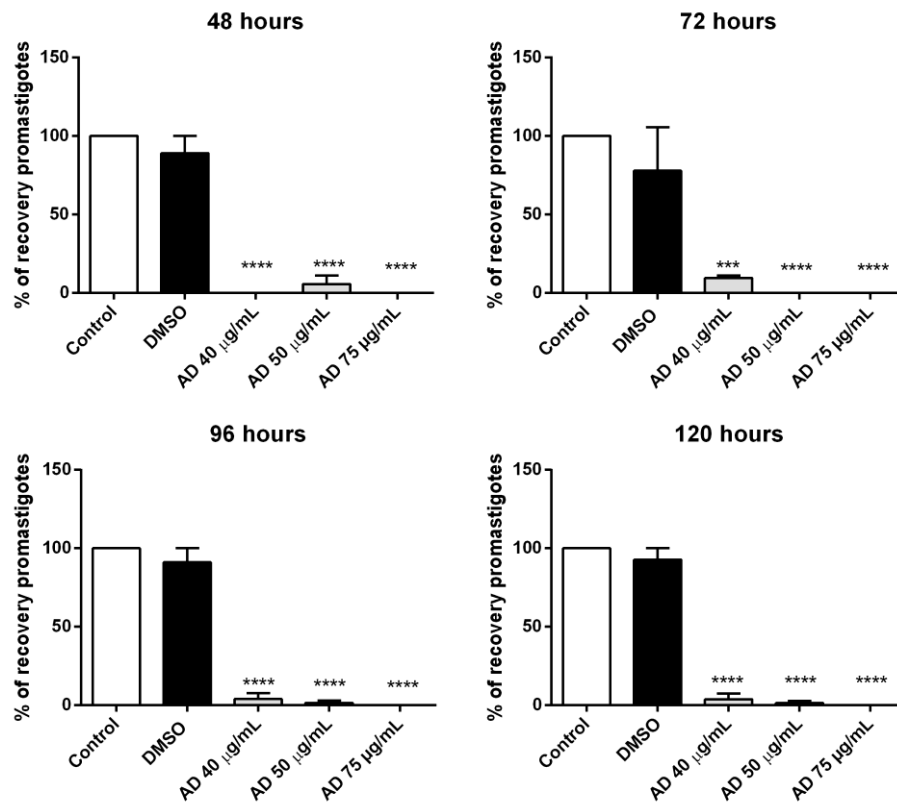


**Figura 12** – Atividade de ácido diidroabiético sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados por 24 horas com 40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$  de AD e foram avaliados a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas por macrófago (B). Anfotericina B (AmB) foi utilizada como controle positivo, DMSO 0,1% (diluente do AD) e Infected Control (macrófagos infectados com *L. amazonensis* sem tratamento) como controle negativo. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*\* ( $p \leq 0.001$ ) \*\*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ) em relação ao controle infectado não tratado.

#### 4.8 Teste de recuperação de promastigotas

Embora os macrófagos sejam as principais células fagocíticas e leishmanicidas, nem sempre a fagocitose é acompanhada pela eliminação do parasito, isso ocorre devido mecanismos de evasão desses parasitos, como a degradação de enzimas lisossomais, consumo de *L*-arginina que resulta na redução da produção de óxido nítrico, *down* regulação do “burst” oxidativo, levando à sobrevivência e proliferação dos parasitos dentro dos macrófagos, (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013), por isso compostos com atividade anti-amastigota são de grande interesse.

Para confirmar a atividade leishmanicida do AD sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*, foi realizado o ensaio de recuperação das formas promastigotas após 48, 72, 96 e 120 horas. Este ensaio consiste na transferência das células infectadas para condições ideais de diferenciação de amastigotas viáveis em promastigotas livres. Desta forma, observou-se que as concentrações de 40, 50 e 75 µg/mL reduziram mais de 90% o número de formas promastigotas recuperadas em todos os tempos testados em relação ao controle (Figura 13), confirmando a atividade leishmanicida exercida por AD sobre formas amastigotas.



**Figura 13** – Ação do ácido diidroabiético na recuperação de formas promastigotas a partir de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos infectados com os *L. amazonensis* foram tratados durante 24 horas com 40, 50 e 75 µg/mL de AD, em seguida foram incubados com meio 199 em B.O.D à 24°C para a saída de formas promastigotas, durante 24, 48, 72 e 96 horas. A quantidade de parasitos recuperados foram contados diariamente na câmara de Neubauer. DMSO 0,1% (Diluyente de AD) e *Control* (macrófagos infectados sem tratamento) foram utilizados como controle negativo. Os valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*\* diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,0001$ ).

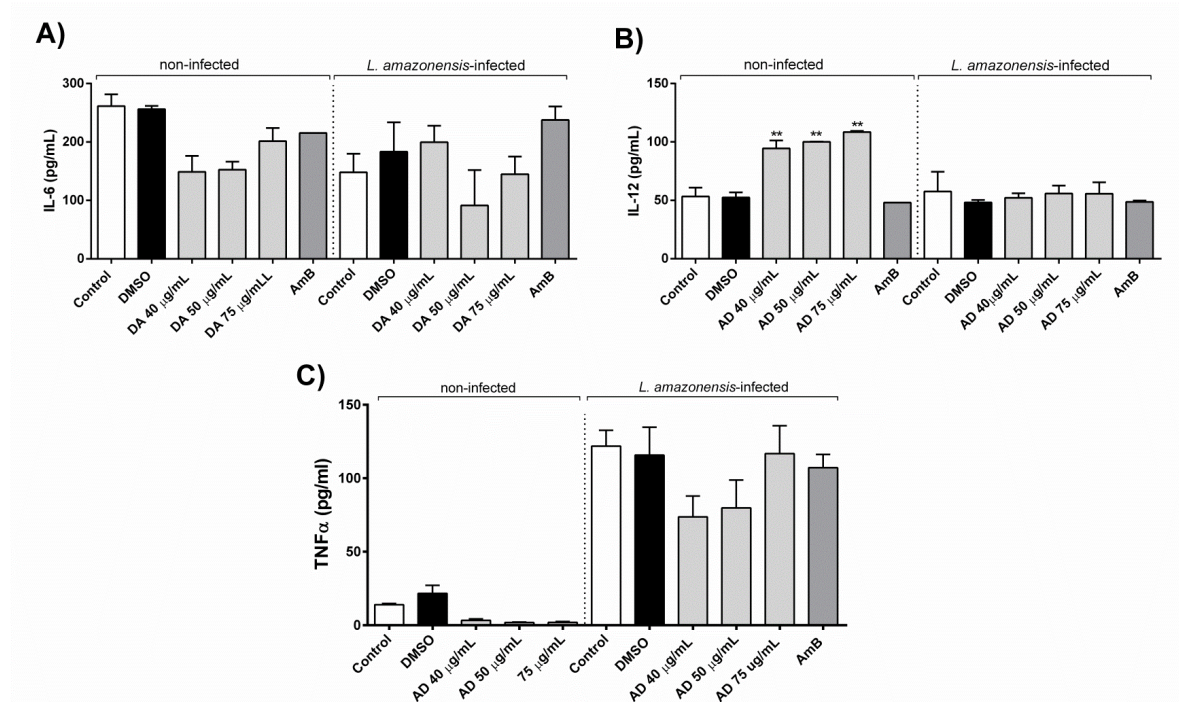
#### 4.9 Determinação dos níveis de citocinas

Na tentativa de verificar se o ácido diidroabiético é capaz de induzir a produção de citocinas por macrófagos infectados ou não, foi avaliada a produção de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após 24 horas de tratamento. Os resultados mostram que o composto nas concentrações testadas não foi capaz de alterar os níveis IL-6 e TNF- $\alpha$  em macrófagos com e sem infecção em relação aos controles, mas este tratamento pode induzir a produção IL-12 em macrófagos não infectados. Contudo a infecção por *L. amazonensis* foi capaz de reverter à secreção desta citocina (Figura 14B).

Sabe-se que IL-12 é uma citocina pluripotente que interage com células T e NK desempenhando um papel importante na iniciação e manutenção de respostas Th1 e na produção de IFN- $\gamma$ , citocinas importantes na eliminação de protozoários do gênero *Leishmania* (GHALIB et al., 1995). Contudo, o tratamento não alterou a produção de IL-12.

Estudos mostram a capacidade deste protozoário em *down*-regular a produção de citocinas como IL-12, IL-17 e IL-6 quando submetidos a estímulos como LPS, sendo a *L. amazonensis* mais imunossupressora do que a *L. major* (LAPARA; KELLY, 2010).

Com relação aos níveis de IL-1 $\beta$  estes estavam abaixo dos níveis de detecção (8 pg/mL) (dados não mostrados).



**Figura 14** – Efeito do ácido diidroabiético na produção de citocinas por macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos infectados e não infectados foram tratados com ácido diidroabiético nas concentrações de 40, 50 e 75 µg/mL por 24 horas e analisados por ELISA. A) IL-6 B) IL-12 e C) TNF-α, os valores foram expressos em pg/mL de citocina. Anfotericina B (AmB) foi utilizada como controle positivo da atividade leishmanicida, DMSO 0,1% (diluyente do AD) e Control (Macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou não, sem tratamento) foram utilizados como controle negativo. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes. \*\*( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.10 Determinação dos níveis de NO e EROs em macrófagos peritoneais

Com o intuito de compreender os possíveis efeitos microbicidas desencadeados pelo AD em macrófagos infectados, foram determinados os níveis de nitrito e espécies reativas de oxigênio.

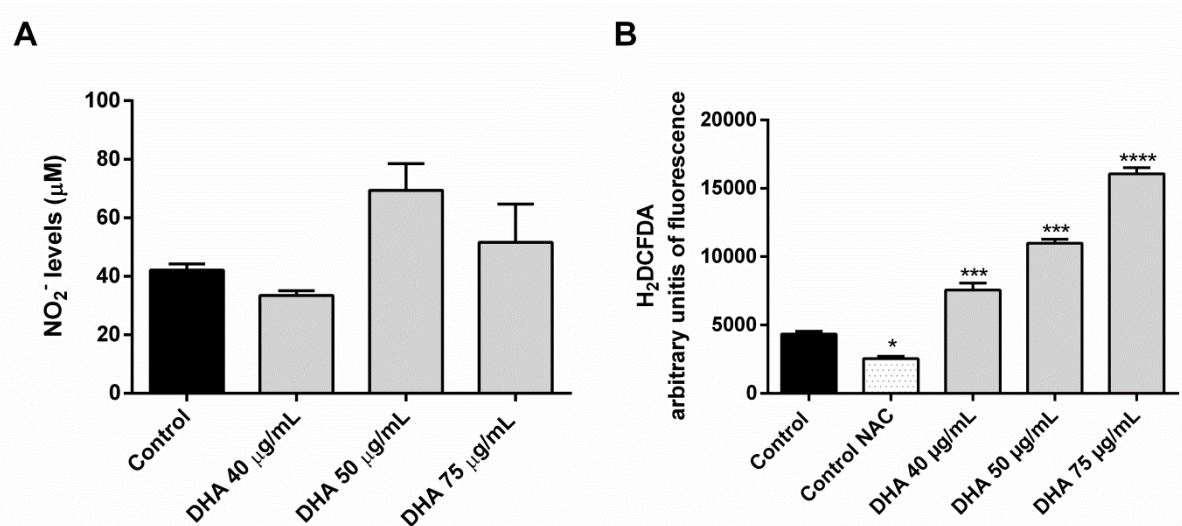
Sabendo que as citocinas pró-inflamatórias são mediadores importantes na indução da síntese de NO via iNOS em macrófagos, como esperado, o tratamento com AD não foi capaz de alterar estes níveis (Figura 15 A).

Diferentemente Jang e Yang (2011) mostraram que o AD isolado a partir *Phellinus pini* nas concentrações de 30 e 50  $\mu\text{M}$  inibiu a produção de óxido nítrico em macrófagos tipo RAW 264,7 estimulados com LPS.

Sabe-se que a o parasito *Leishmania* spp., pode interferir na produção de NO em macrófagos por diferentes mecanismos de evasão como: clivagem da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa\text{B}$ , do qual a ativação da enzima iNOS e vários mediadores pró-inflamatórios são dependentes, afetando consequentemente a expressão de iNOS e a produção de NO (GREGORY et al., 2008); além disso, este parasito possui a enzima arginase, utilizando para seu próprio metabolismo o aminoácido L-arginina, substrato para a síntese de NO via iNOS (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999).

Embora o NO seja uma importante molécula microbicida, EROs também são consideradas moléculas efetivas na defesa contra patógenos intracelulares (MANDAL et al., 2016). Os resultados do presente trabalho mostraram que o tratamento nas concentrações de 40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$  aumentaram EROs significativamente quando comparado ao grupo controle de forma concentração dependente (Figura 15 B).

Estes resultados complementam os encontrados no ensaio leishmanicida de formas amastigotas e permite inferir que os parasitos estão sendo eliminados pela produção de EROs por macrófagos infectados e tratados ou por efeito direto do AD sobre as formas amastigotas resultando na aumento da produção de EROs induzidas pelo tratamento.



**Figura 15** – Produção de  $\text{NO}_2^-$  e EROs em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com AD. Os seguintes ensaios foram utilizados para avaliar A) níveis de  $\text{NO}_2^-$  em sobrenadante e B) produção de EROs em macrófagos infectados tratados nas concentrações de 40, 50 e 75  $\mu\text{g/mL}$  de AD por 24 horas. *Control* (macrófagos infectados com *L. amazonensis*) foi utilizado como controle positivo e *Control NAC* (macrófagos infectados com *L. amazonensis* e NAC) Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. Diferença significativa em relação ao controle \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,01$ ) e \*\*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os métodos de separação realizados na resina de *Pinus elliottii* resultaram em um único composto com rendimento elevado, onde o ácido diidroabiético pode ser identificado por meio das técnicas de elucidação estrutural.

De acordo com o estudo *in silico* realizado através das regras de Lipinski, o composto apresentou apenas uma única violação no quesito lipofilicidade, estando ainda dentro dos outros parâmetros estabelecidos pela regra.

O presente estudo é o primeiro a tratar da investigação acerca do efeito do AD sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como a elucidação dos mecanismos envolvidos.

O AD apresentou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas em baixas concentrações, sendo capaz de induzir alterações morfológicas, morte (*apoptose tardia*) do parasito pela exposição de fosfatidilserina, perda da integridade de membrana e aumento na produção de EROs.

O tratamento com AD foi capaz de atuar sobre formas amastigotas de maneira concentração dependente, reduzindo a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos, sem apresentar efeitos tóxicos para a célula e eritrócitos humanos.

Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com as concentrações testadas de AD não alteraram a síntese das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-6) e NO nesta célula, no entanto houve o aumento da produção de EROs, acarretando na morte do parasito ou sendo consequência da ação direta do tratamento.

Diante do exposto, conclui-se que o AD é um promissor ponto de partida para avaliação de alternativas terapêuticas para a leishmaniose. Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho estimulam o desenvolvimento de outros estudos com AD no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos na atividade leishmanicida, merecendo estudos adicionais pré-clínicos e clínicos como uma possível terapia para a infecção por *Leishmania*.

## REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, S. R. et al. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, n. 10, p. 925–933, 2006.
- AMOO, S. O. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. **Complementary & Alternative Medicine**, p. 1–9, 2012.
- ARAMBAGE, S. C. et al. Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. **Parasites & vectors**, v. 2, n. 1, p. 32, 2009.
- ARAUJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 751–754, 1998.
- ARGUELLO, R. J. et al. Protein synthesis regulation , a pillar of strength for innate immunity ? **Current Opinion in Immunology**, p. 28–35, 2015.
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1998.
- BARATA, L. E. S. et al. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 589–595, 2000.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- BARRETT, M. P.; GILBERT, I. H. Perspectives for New Drugs Against Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 471–482, 2002.
- BELLIK, Y. et al. Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 6, n. 2, p. 147–58, 2012.
- BOECK, P. et al. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1360–1366, 2005.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, v. 15, n. 1, p. 22–28, 1999.
- BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology research**, p. 1–11, 2016.
- BOUCHIER-HAYES, L. et al. Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 222–228, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tegumentar americana**. [s.l.: s.n.].

- BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, 2003.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- CARRUBA, G. et al. A Traditional Mediterranean Diet Decreases Endogenous Estrogens in Healthy Postmenopausal Women A Traditional Mediterranean Diet Decreases Endogenous Estrogens in Healthy Postmenopausal Women. **Nutrition and Cancer**, v. 56, n. 2, p. 253–259, 2006.
- CHEN, M. et al. Licochalcone A , a Novel Antiparasitic Agent with Potent Activity against Human Pathogenic Protozoan Species of Leishmania. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 12, p. 2550–2556, 1993.
- CHOI, B. S.; KROPF, P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 199–209, 2009.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Secondary Metabolites. **Biochemistry Molecular Biology of Plants**, v. 7, n. 7, p. 1250–1318, 2000.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002.
- DA SILVA, S. S. et al. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- DATASUS; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Paraná. p. 1–5, 2017.
- DE SOUZA, W. **Doenças Negligenciadas**. [s.l.: s.n.].
- DESJEUX, P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. **Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.
- DIAS, F. R. F. et al. Resgatando um método eficiente para determinação do ponto de ebulição de substâncias orgânicas: Percolador versus Siwoloboff. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 915–918, 2014.
- DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 11, p. 536–542, 2006.
- DUTTA, A. et al. Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in Leishmania donovani. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1196–1204, 2007.

- EBADI, P.; KARIMI, M. H.; AMIRGHOFAN, Z. Plant components for immune modulation targeting dendritic cells: Implication for therapy. **Immunotherapy**, v. 6, n. 10, p. 1037–1053, 2014.
- ELSON, C. E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6 Suppl, p. 1666–1672, 1995.
- EXARCHOU, V. et al. LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 681–687, 2005.
- EXARCHOU, V. et al. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 293–302, 2006.
- FALCON-LANG, H. J.; MAGES, V.; COLLINSON, M. The oldest Pinus and its preservation by fire. **Geology**, v. 44, n. 4, p. 303–306, 2016.
- FALLARERO, A. et al. (+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 12054–12072, 2013.
- FIDAN, I. et al. The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine. **Journal of Neuroimmunology**, v. 171, p. 184–188, 2006.
- FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.
- FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- GERNANDT, D. S. et al. Use of Simultaneous Analyses to Guide Fossil-Based Calibrations of Pinaceae Phylogeny. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 8, p. 1086–1099, 2008.
- GHALIB, H. W. et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 4623–4629, 1995.
- GILBERT, I. H. Target-based drug discovery for human African trypanosomiasis: selection of molecular target and chemical matter. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 28–36, 2014.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.
- GONZÁLEZ, M. A. Aromatic abietane diterpenoids: Total syntheses and synthetic studies. **Tetrahedron**, v. 71, n. 13, p. 1883–1908, 2015.

- GONZÁLEZ, P. et al. In vitro activity of C20 -diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 136–141, 2005.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767–776, 2007.
- GORDALIZA, M. Terpenyl-purines from the sea. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 833–849, 2009.
- GOUIRIC, S. C. et al. 1',7'-Dihydroxydehydroabiatic acid, a new biotransformation product of dehydroabiatic acid by *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 281–284, 2004.
- GRANDIC, S. R. et al. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biome**, v. 58, p. 388–392, 2004.
- GREGORY, D. J. et al. A novel form of NF- $\kappa$ B is induced by *Leishmania* infection: Involvement in macrophage gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1071–1081, 2008.
- GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155–184, 2013.
- HANDLER, M. . et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of American Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.
- HENARD, C. A. et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. **Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- HUANG, X. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Design , synthesis and in vitro evaluation of novel dehydroabiatic acid derivatives containing a dipeptide moiety as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 370–385, 2015.
- ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 74–85, 2013.
- JANG, H. J.; YANG, K. Inhibition of Nitric Oxide Production in RAW 264 . 7 Macrophages by Diterpenoids from *Phellinus pini*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 6, p. 913–917, 2011.
- JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 104, p. 1–15, 2010.
- KALAUNI, S. K. et al. Antimalarial activity of cassane- and norcassane-type

diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure-activity relationship. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1050–2, 2006.

KAM, T. S. et al. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 75–79, 1999.

KAMM, A et al. The genomic and physical organization of Ty1-copia-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliottii* var. *elliottii* and other gymnosperms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 2708–2713, 1996.

KANG, M. et al. Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, p. 333–338, 2008.

KATHURIA, M. et al. Induction of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in *Leishmania donovani* by orally active clerodane diterpene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916–5928, 2014.

KAYSER, O. et al. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 77, p. 307–314, 2000.

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected Tropical Diseases: Infection, Modeling, and Control. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, n. 1, p. 53–69, 2015.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 177–85, 2010.

KEELING, C. I.; BOHLMANN, J. Diterpene resin acids in conifers. **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p. 2415–2423, 2006.

KELLER, T. H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. A practical view of “druggability”. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 357–361, 2006.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. MARCH, p. 206–220, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 463–471, 1999.

KRUTOVSKY, K. V. et al. Comparative mapping in the pinaceae. **Genetics**, v. 168, n. 1, p. 447–461, 2004.

LANGENHEIM, J. H. **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, ethnobotany**. [s.l.: s.n.].

LANGER, T. et al. Pharmacophore-based screening for the successful identification of bio-active natural products. **Chimia**, v. 61, n. 6, p. 350–354, 2007.

LAPARA, N. J.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in

macrophages infected with Leishmania. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 8, 2010.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; LOUIS, J. A. In susceptible mice , Leishmania major induce very rapid interleukin-4 production by CD4 + T cells which are NK1.1-. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 3298–3307, 1995.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LUO, D. et al. Dehydroabietic Acid Derivative QC4 Induces Gastric Cancer Cell Death via Oncosis and Apoptosis. **biomed Research International**, v. 2016, 2016.

MAHIOU, V. et al. New aporphine alkaloids from Guatteria Foliosa. **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 7, p. 890–895, 1994.

MANDAL, A. et al. Deprivation of L-Arginine Induces Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Leishmania donovani Promastigotes: Contribution of the Polyamine Pathway. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–26, 2016.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1586–1599, 2003.

MARTINEZ-VILALTA, J.; SALA, A.; PIÑOL, J. The hydraulic architecture of Pinaceae - a review. **Plant Ecology**, v. 171, n. 1, p. 3–13, 2004.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic Death in Leishmania donovani Promastigotes in Response to Respiratory Chain Inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11798–11813, 2004.

MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 323–329, 2012.

MITTAL, N. et al. Protective Effect of Picroliv from Picrorhiza kurroa against leishmania donovani infections in mesocricetus auratus. **Life Sciences**, v. 63, n. 20, p. 1823–1834, 1998.

MONZETE, L. et al. Activity , toxicity and analysis of resistance of essential oil from Chenopodium ambrosioides after intraperitoneal , oral and intralesional administration in BALB / c mice infected with Leishmania amazonensis : A preliminary study. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 61, p. 148–153, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MYHRE, O. et al. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 10, p. 1575–1582, 2003.

NYREN, V.; BACK, E. **Ionization constant, solubility product and solubility of abietic and dehydroabietic acid** *Acta Chemica Scandinavica*, 1958.

OLIVEIRA, W. N. et al. Cytokine The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

PAJARI, K. The bark and the oil of the bark of *Pinus sylvestris*. **Ac. Sci. Fen. Chemica**, v. 59A, n. 6, p. 7–160, 1942.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PENG, G.; ROBERTS, J. C. Solubility and toxicity of resin acids. **Water Research**, v. 34, n. 10, p. 2779–2785, 2000.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **National Institutes of Health**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2009.

PFERSCHY-WENZIG, E. M. et al. In Vitro Anti-inflammatory Activity of Larch (*Larix decidua* L.) Sawdust. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11688–11693, 2008.

PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, p. 12–15, 1995.

PORTO, T. S. et al. Pimarane-type diterpenes: Antimicrobial activity against oral pathogens. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 191–199, 2009.

RATH, S. et al. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, p. 581–596, 2007.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 447–455, 2010.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, 2005.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, 1998.

RUBIO, J. et al. Trypanocidal Activity of Oleoresin and Terpenoids Isolated from *Pinus oocarpa*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, p. 711–716, 2005.

SAHA, P. et al. Berberine chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like

death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Free radical research**, v. 43, n. 11, p. 1101–10, 2009.

SALAZAR-SUAZÓ, N. et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 12, p. 801–811, 1999.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 4, p. 195–203, 2000.

SHAW, J. T. Naturally diverse: highlights in versatile synthetic methods enabling target- and diversity-oriented synthesis. **Natural product reports**, v. 26, n. 1, p. 11–26, 2009.

SMITH, S. Y. et al. A new species of *Pityostrobus* (Pinaceae) from the Cretaceous of California: moving towards understanding the Cretaceous radiation of Pinaceae. **Journal of Systematic Palaeontology**, v. 2019, n. February, p. 1–13, 2016.

SU, S. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 251–258, 2011.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, p. 1–16, 2015.

TANAKA, R.; TOKUDA, H.; EZAKI, Y. Cancer chemopreventive activity of “rosin” constituents of *Pinus sp.* and their derivatives in two-stage mouse skin carcinogenesis test. **Phytomedicine**, v. 15, n. 11, p. 985–992, 2008.

TAPIA ET. AL. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 131–133, 1997.

TATSIS, E. C. et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 383–393, 2007.

TORRES-SANTOS, E. . et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, p. 114–120, 2004.

ULLAH, N. et al. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 12, p. 1905–1925, 2016.

VAHERMO, M. et al. Antiprotozoal activity of dehydroabietic acid derivatives against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. **Medicinal Chemical Communications**, v. 7, p. 1–3, 2015.

VAN BEEK, T. A. et al. Fungal biotransformation products of dehydroabietic acid. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 154–159, 2007.

VARGAS, F. D. S. et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 2015.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, 2015.

WANG, B. et al. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1141–1151, 2011.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **weekly epidemiological record**, n. 83, p. 285–296, 2016.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: The synthesis connection. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 8329–8351, 2006.

WULLSCHLEGER, S. D.; MCLAUGHLIN, S. B.; AYRES, M. P. High-resolution analysis of stem increment and sap flow for loblolly pine trees attacked by southern pine beetle. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 11, p. 2387–2393, 2004.

YAMEY, G; HOTEZ, P. Neglected tropical diseases. **PloS**, v. 335, n. August, p. 267–270, 2007.

## APÊNDICES

### Apendice A -Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do ácido diidroabiético

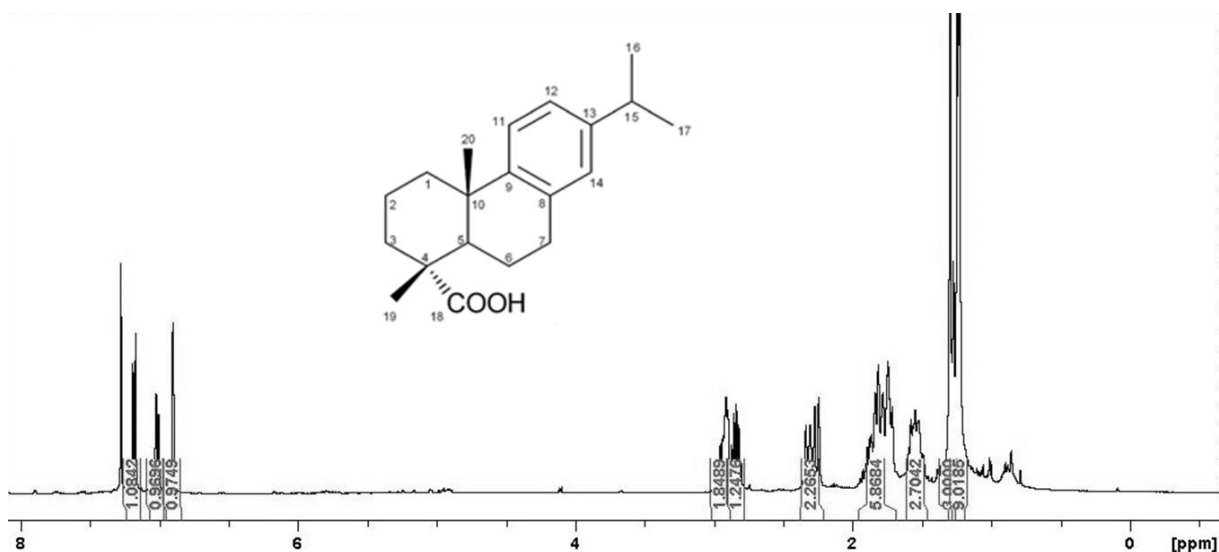


Figura 16 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz)  $\text{CDCl}_3$  (0-12)

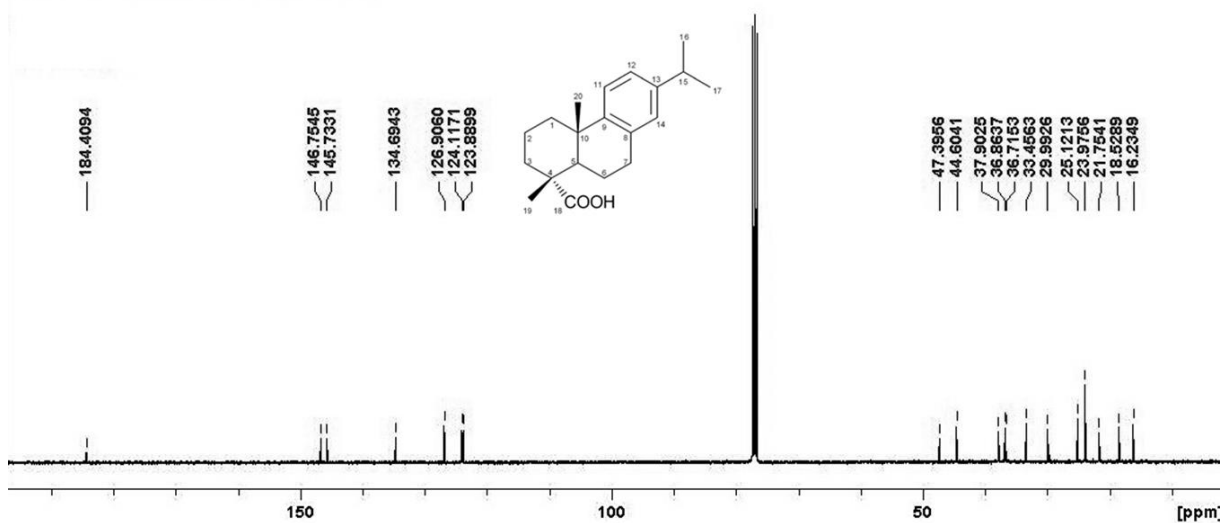


Figura 17 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do AD (100,61 MHz)  $\text{CDCl}_3$

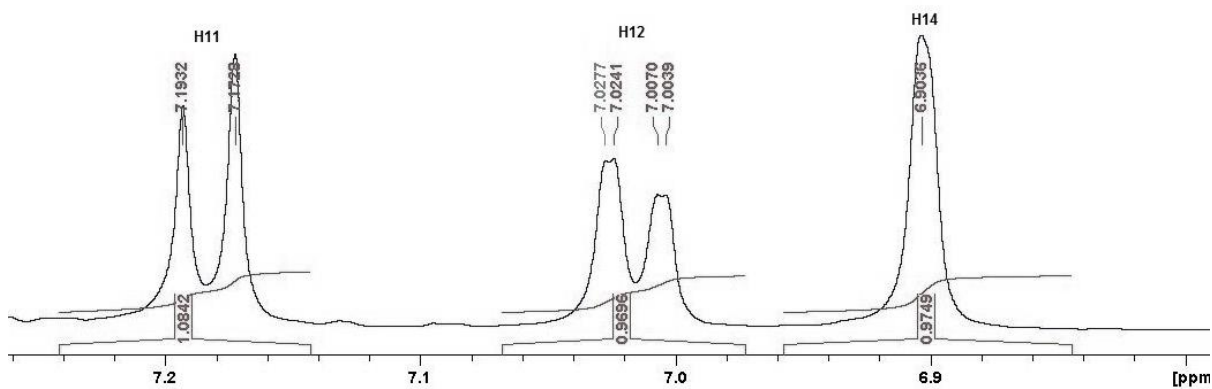
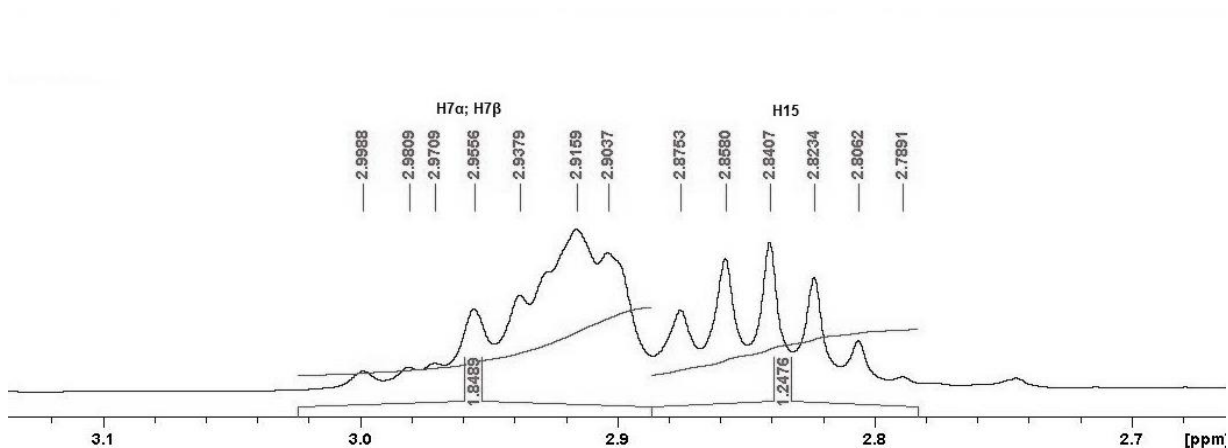
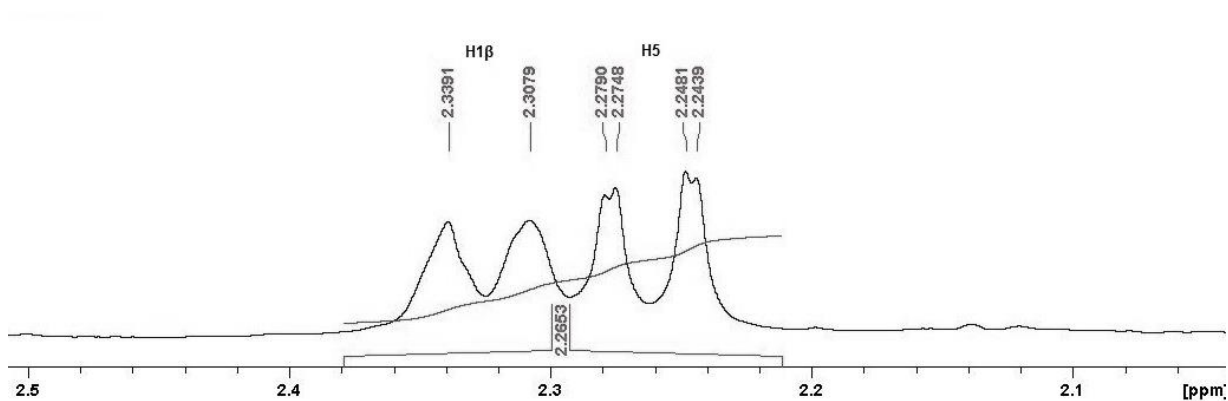


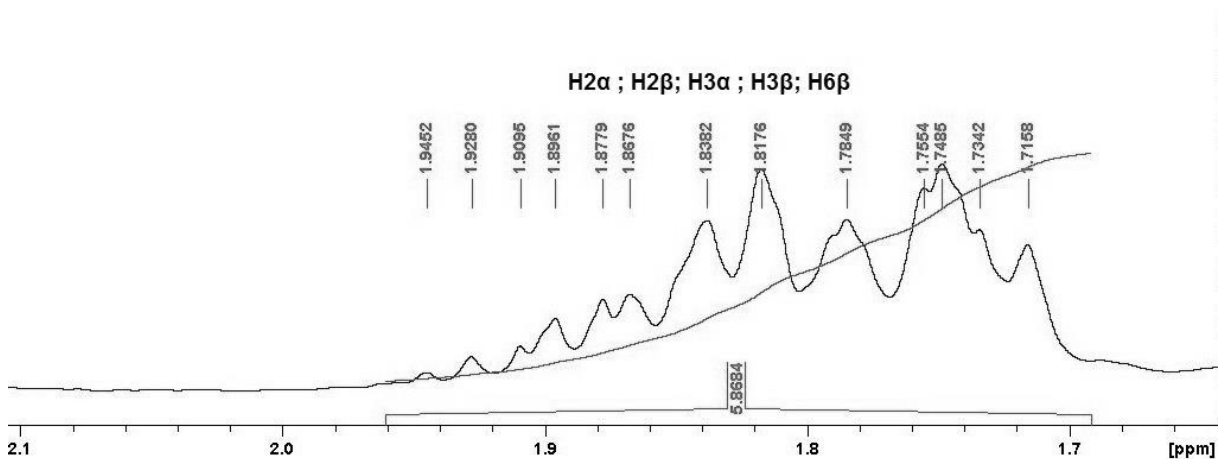
Figura 18 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 6,80 a 7,95 ppm.



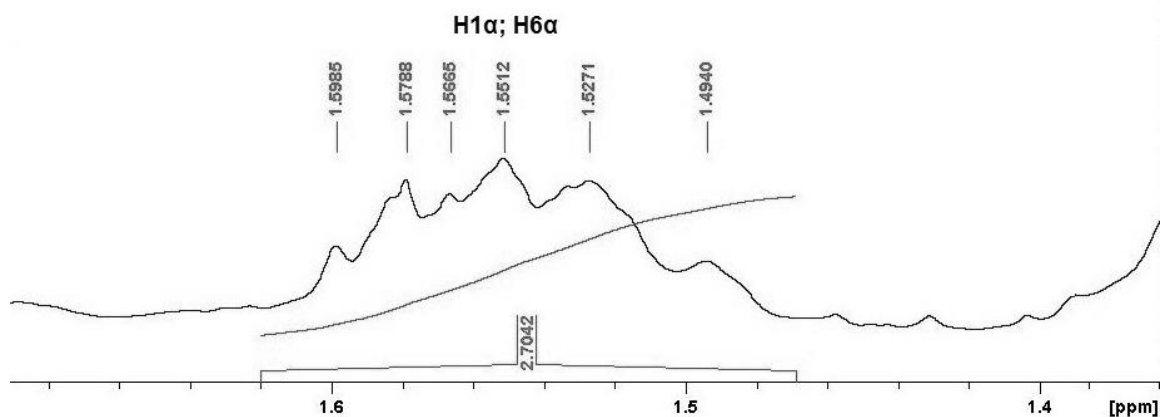
**Figura 19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 2,65 a 3,35 ppm.



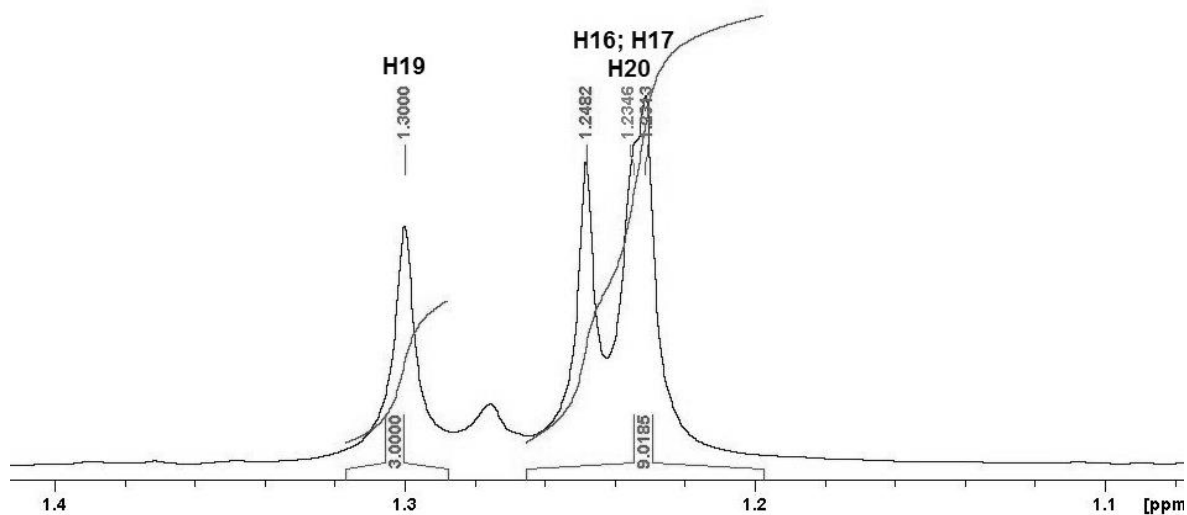
**Figura 20** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 2,10 a 2,50 ppm.



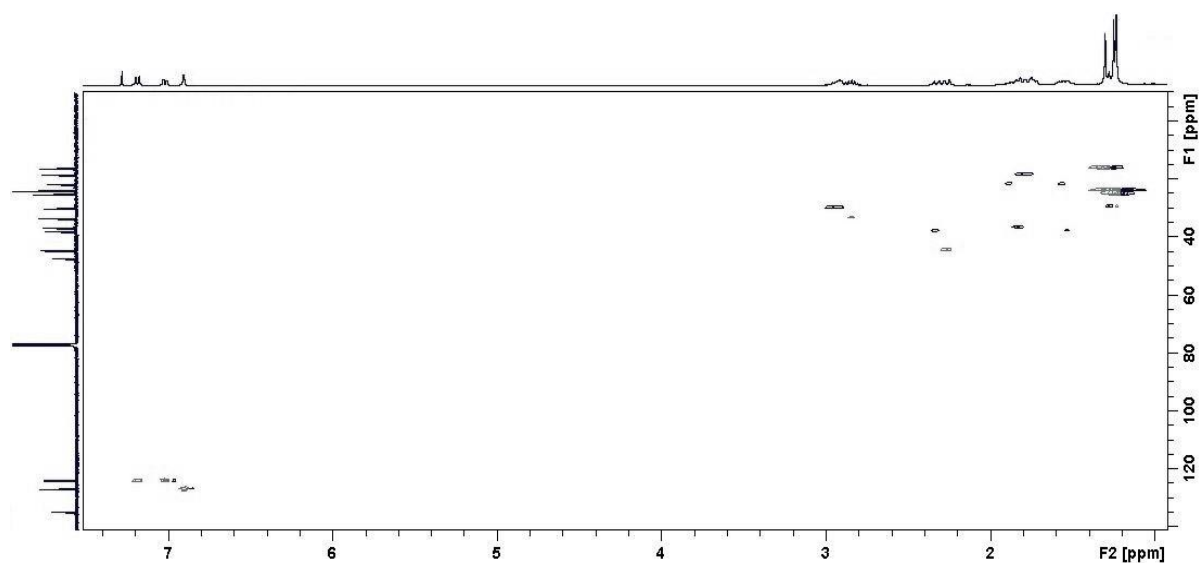
**Figura 21** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,70 a 2,10 ppm.



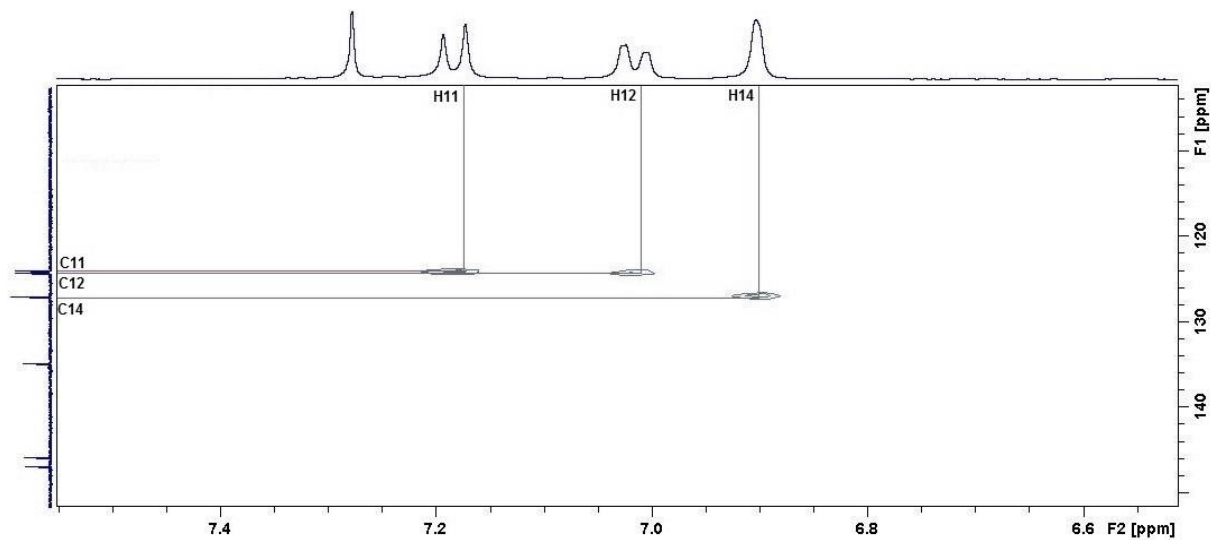
**Figura 22** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,40 a 1,70 ppm.



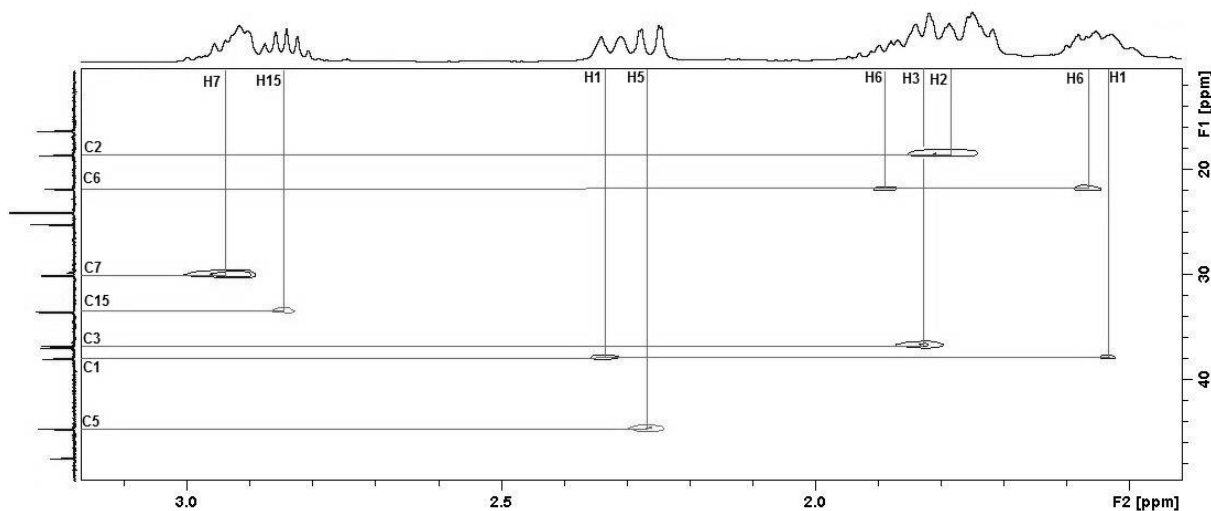
**Figura 23** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do AD (400,13 MHz) expansão na região de 1,10 a 1,40 ppm.



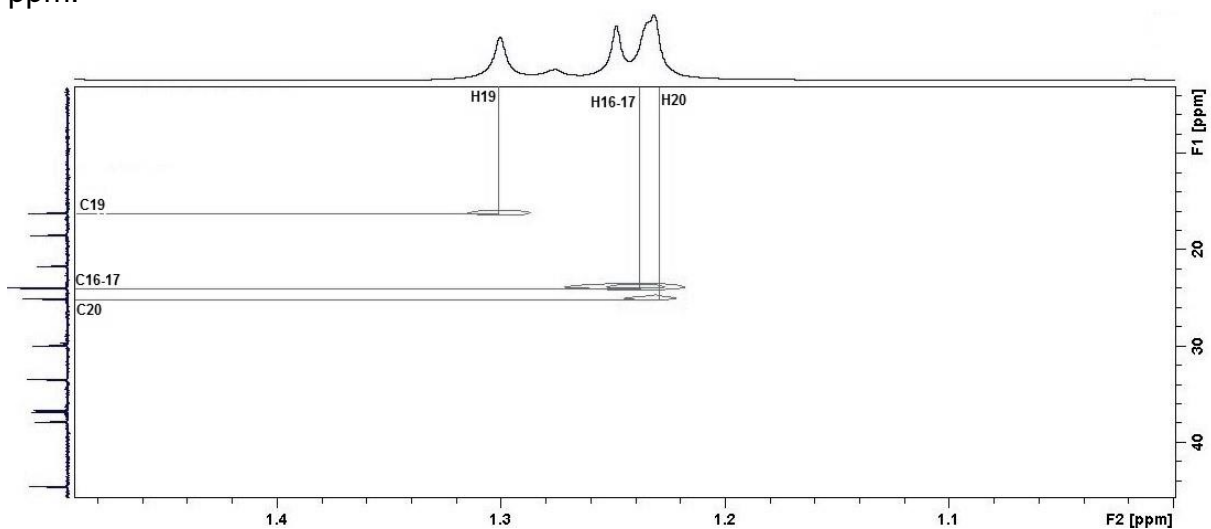
**Figura 24** - Espectro de HSQC do AD em  $\text{CDCl}_3$



**Figura 25** – Espectro de HSQC do AD em  $\text{CDCl}_3$  expansão na região de 6,60 a 7,40 ppm.

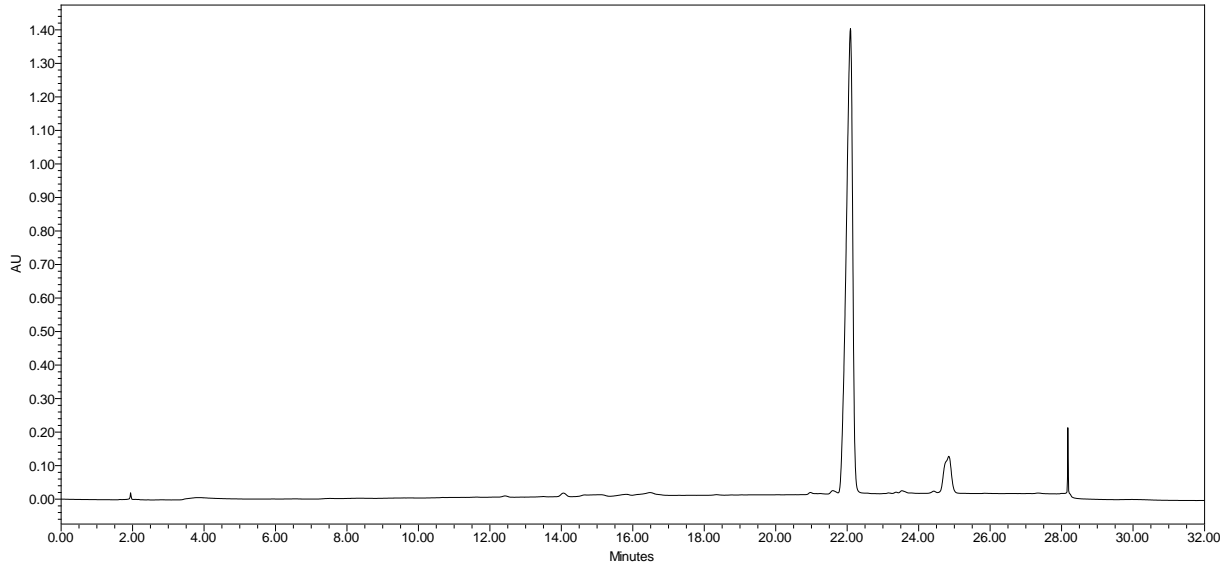


**Figura 26** – Espectro de HSQC do AD em  $\text{CDCl}_3$  expansão na região de 2,00 a 3,02 ppm.



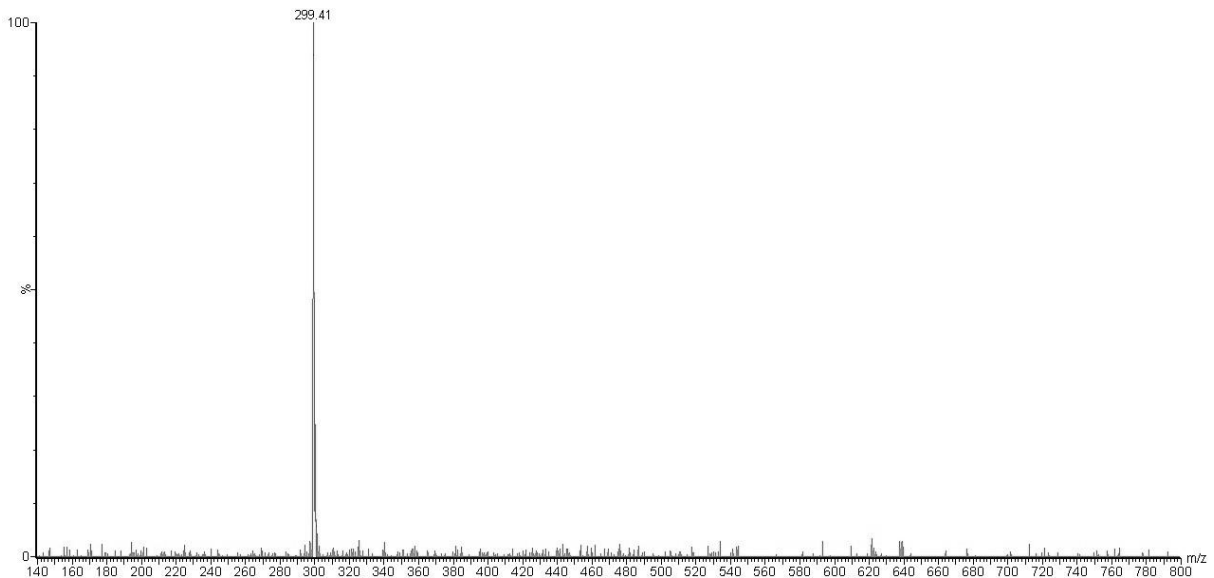
**Figura 27** – Espectro de HSQC do AD em  $\text{CDCl}_3$  expansão na região de 1,00 a 1,50 ppm.

## APÊNDICE B: UPLC – MS



**Figura 28** – Cromatograma do ácido diidroabiético(UPLC-MS)

UPLC® Acquity I-Class Waters: Fase móvel A: água ultrapura; B: Acetonitrila conforme eluição de gradiente. Vol. de injeção 20  $\mu\text{L}$  no modo negativo. AD ( $100 \text{ mg/L}^{-1}$ ) coluna Phenomenex Luna C18 (2,50 x 4.60 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) à  $30^\circ\text{C}$ . Detector Acquity TQD no modo de ionização negativo.



**Figura 29** – Espectro de massas atribuído ao ácido diidroabiético  $m/z$  299,41 obtido do cromatograma do empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo. Temperatura do gás de dessolvatação ( $500^\circ\text{C}$ ) com vazão ( $900 \text{ L h}^{-1} \text{ N}_2$ ) fluxo do gás do cone ( $20 \text{ L h}^{-1} \text{ N}_2$ ), temperatura da fonte ( $120^\circ\text{C}$ ), voltagens: cone (30V), cone extrator (2V), capilar (3,5 KV).

## APÊNDICE C

Aprovação do Projeto pelo comitê de ética animal.



D CF

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 101/2016

Londrina, 31 de Maio de 2016.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "*Pinus elliottii* (Pinaceae): isolamento, identificação de diterpenos e avaliação da atividade leishmanicida", protocolo CEUA nº 6955.2016.59, sob a responsabilidade de **Nilton Syogo Arakawa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em 24/05/2016.

O objetivo do projeto é promover o isolamento, a purificação e a identificação do diterpenos da resina de *Pinus elliottii* e avaliar a sua atividade leishmanicida dos principais componentes desse material. Para isso as células peritoneais dos animais passarão pelas seguintes avaliações: 1) Ensaio de viabilidade celular por MTT; 2) Ensaio Fagocítico; 3) Ensaio de recuperação de promastigotas; 4) Quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA) por HPLC. Os animais serão anestesiados com inalação de isofurano e posteriormente submetidos a eutanásia (deslocamento cervical). GI 1.

Vigência do Projeto	02/03/2015 a 24/02/2017
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	50
Peso/Idade	25g / 6 a 8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Fiocruz/Curitiba
Amostras a serem coletadas	Células peritoneais

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa**

Coordenador do Projeto

Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas

Com cópia para Chefe do Departamento de Química e Diretor(a) do Centro de Ciências Exatas

Campus Universitário: Rodovia Caixa Postal 101, km 300 - Fone (541) 371-4989 FAXS - Fax 3025-4440 - Caixa Postal 19081 - CEP 84051-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRIANA PARANA BRASÍLIA