



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MANOELA DAIELE GONÇALVES

**ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO  
E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ANÁLOGOS  
BIOTRANSFORMADOS DO ÁCIDO CAURENÓICO**

---

Londrina  
2021

MANOELA DAIELE GONÇALVES

**ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO  
E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ANÁLOGOS  
BIOTRANSFORMADOS DO ÁCIDO CAURENÓICO**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ivete C. Costa

Londrina  
2021

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

G635 Gonçalves, Manoela Daiele .  
ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ANÁLOGOS BIOTRANSFORMADOS DO ÁCIDO CAURENÓICO / Manoela Daiele Gonçalves. - Londrina, 2021.  
197 f. : il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.  
Coorientador: Ivete Conchon-Costa.  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Biotransformação - Tese. 2. Atividade Antiprotozoária - Tese. 3. Produtos naturais - Tese. 4. Sphageticola trilobata - Tese. I. Arakawa, Nilton Syogo. II. Conchon-Costa, Ivete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

MANOELA DAIELE GONÇALVES

**ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO  
E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ANÁLOGOS  
BIOTRANSFORMADOS DO ÁCIDO CAURENÓICO**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutora em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Alexandre Orsato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profª Drª. Danielle Lazarin Bidóia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profª Drª. Milena Menegazzo Miranda Sapla  
Universidade Vale do Itajaí – UNIVALI

---

Profª Drª. Suraia Said  
Universidade São Paulo - USP

Londrina, 20 de agosto de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por cada segundo que me concedeu até aqui com saúde, disposição além de me capacitar cada vez mais. Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Nilton Syogo Arakawa, que abriu as portas do laboratório além de confiar no meu trabalho, me deixando livre pra desenvolver minha identidade, para me descobrir e amar cada pedacinho da minha pesquisa. Também em especial a minha coorientadora professora Dr<sup>a</sup>. Ivete Conchon Costa, que despertou em mim o amor pelo estudo das doenças negligenciadas, me acolheu como família além de me dar autonomia dentro do laboratório no qual eu entrei para fazer uma parceria. Ao professor Dr. Wander Rogério Pavanelli por toda amizade, ajuda e bronca, por me acolher igualmente como aluna e acreditar na minha capacidade, mesmo tendo outra formação. A professora Dr. Idessania Nazareth Costa e Prof. Dr. Danielle Lazzarin Bidóia por todo auxílio, esclarecimento e ajuda dentro do laboratório.

A toda minha família, foram quatro anos de muitos acontecimentos, muitas alegrias e muitas perdas e em todos os momentos tive grande apoio. Especialmente a minha vó Luzia Candida Barbosa de Oliveira, por todos os conselhos, ensinamentos e consolo durante esse período. Aos meus pais Leonice de Oliveira Gonçalves e José Joaquim Gonçalves por serem a luz da minha vida e minha base, por vocês não tenho palavras para descrever toda minha gratidão e amor. A minha irmã Maria Gabriela Gonçalves, mesmo com tantas desavenças, por todo amor e parceria. Aos meus padrinhos e madrinhas Valdelice de Oliveira, Odenis de Oliveira Martins e Carlos Martins por me tratarem como filha, e durante todo esse período longe dos meus pais, me darem todo suporte necessário me tratando como filha.

Aos meus amigos minha eterna gratidão, amizade não é questão de tempo e sim de afinidade, a gente sente quando é pra vida. Inicialmente agradeço a todos os meus amigos do laboratório de Biotransformação e fitoquímica e Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer principalmente a minhas amigas e amigos do coração que com toda certeza levarei pra vida toda: Bruna Taciane da Silva Bortoleti por ser meu braço direito, uma irmã e parceira que conquistei na pós graduação; a Fernanda Tomiotto Pellissier por toda amizade e irmandade, ensinamento e por ser sábia em todos os conselhos; a Virginia Márcia Concato por ser minha irmã branca, amiga, parceira e por me fazer me sentir próxima

de Deus; a Milena Menegazzo Miranda Sapla por ser um exemplo de mulher na minha vida, e que não mediu esforços para me ajudar em tudo o que eu precisei desde o primeiro dia no laboratório, a minha protegida Mariana Detoni por ser sempre doce e amável e estar sempre disposta a ajudar, e a todos do laboratório; ao Ricardo Luís Nascimento de Matos por toda amizade, ajuda, auxílio e por ser um amigo em todas as horas desde a parte experimental até mesmo os outros momentos da vida; a Ana Carolina Jacob Rodrigues que sempre me entendeu em um contexto geral, sempre me enfrentou mas sempre foi fiel a nossa amizade; a Amanda Cristina Machado Carloto por ser uma grande parceira de vida, por me mostrar a leveza em situações difíceis com seu jeito carismático e acolhido, ao Taylon Felipe Silva por ser um amigo sem igual e extremamente necessário em minha vida e a todos os meus amigos conquistados durante meu período acadêmico, que estavam comigo em todos os momentos, como família: Elaine Siqueira, Ellen Mayara Souza Cruz, João Paulo Assolini, Priscila de Camargo Carvalho, Raquel Arruda Sanfelice, gratidão infinita. Aos meus afilhados Arthur Felipe de Marchi Tozzo e Lucca de Barros Carlindo por alegrarem meus dias, tornando muitos momentos ruins em irrelevantes por trazerem leveza ao meu coração e me encher de esperança por dias melhores. Aos meus amigos de vida, que independente de toda minha ausência sempre foram compreensíveis perante minha falta em alguns momentos importantes especialmente a: Aline Barros de Moraes, Angélica Amorim, Barbara Barros de Moraes, Bruno Matheus Simões, Ellenn Christie de Marchi, Lucas Camargo e Renan Guilherme Marim, a vocês todos, meus agradecimentos e meu amor.

“Este trabalho é dedicado aos meus pais que são a luz da minha vida”

Obrigada!

“Não façam do amanhã, o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo, que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás...mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.” Charles Chaplin

**“Mas a despeito da pedra, as flores  
continuam a nascer, crescer, florescer...”**

**Rubem Alves**

Gonçalves, Manoela Daiele. **Atividade tripanocida do ácido grandiflorênico e atividade leishmanicida dos análogos biotransformados do ácido caurenóico**. 2021. 195 f. Tese (Doutorado em Química, Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-UNICENTRO) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

Os diterpenos ácido caurenóico (KA) e grandiflorênico (GFA), metabolitos secundários isolados da *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), são descritos na literatura como antiparasitários, antimicrobianos e antioxidantes, além de possuírem estruturas favoráveis para o processo de biotransformação por fungos filamentosos. A leishmaniose, doença causada por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, são transmitidos ao homem por meio da picada do inseto flebotomíneo. Apresentam diversas manifestações clínicas que vai desde a forma cutânea até a visceral e são dependentes da resposta imune do hospedeiro e da espécie do parasito. A Doença de Chagas é causada por protozoários parasitos do gênero *Trypanosoma cruzi*, os quais são transmitidos ao mamífero pela via vetorial através das fezes de triatomíneos infectados. O curso clínico está dividido em duas principais fases, a aguda e a crônica. O tratamento para ambas as enfermidades apesar de apresentarem eficiência terapêutica relatada, apresentam alta toxicidade ao paciente, causando diversos efeitos colaterais, além de resistência parasitológica resultando muitas vezes na descontinuação do tratamento. Deste modo, tem sido cada vez mais investigado a busca por compostos que possuam abordagem terapêutica para o tratamento dessas doenças. No capítulo II foi realizado o processo de biotransformação do KA pelo fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* e foram obtidos dois análogos cauranos, o ácido 7-hidroxicaurenóico (7OHKA) e o ácido 7,9-diidroxicaurenóico (7,9OHKA). A partir do estudo *in silico*, os compostos apresentaram características favoráveis segundo as regras propostas analisadas. No ensaio de citotoxicidade, por MTT, sobre macrófagos murinos J774A.1, o tratamento com KA (10 a 200  $\mu\text{M}$ ) reduziu a viabilidade celular a partir de 50  $\mu\text{M}$  em 72 h e 96 h, enquanto 7OHKA e 7,9OHKA não diferiram do grupo controle ( $p > 0,05$ ), exceto nas maiores concentrações testadas (150 e 200  $\mu\text{M}$ ). No ensaio de cinética de proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis*, 7OHKA, nos tempos de 72 e 96 h, reduziu a viabilidade em 70 %, e para 7,9OHKA, essa redução foi observada após 96 h de tratamento. Assim, os análogos obtidos demonstraram características favoráveis para o estudo como candidatos em potencial na busca por novos fármacos antiprotozoário. No capítulo III, foi determinado o efeito do GFA sobre formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Os resultados mostraram que o tratamento com GFA reduziu a viabilidade das formas tripomastigotas, com alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitos tratados, observou-se aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), despolarização mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos, presença de vacúolos autofágicos, exposição de fosfatidilserina e danos à membrana plasmática. Além disso, GFA reduziu o número de formas amastigotas por macrófago (J774A.1), sem exibir toxicidade em linhagens de mamíferos (J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, THP-1 e AMJ2-C11). Por conseguinte, GFA aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  e reduziu os níveis de IL-6 em macrófagos infectados. Assim, o tratamento com GFA atuou nas formas tripomastigotas por meio de mecanismo semelhante a apoptose e eliminação de parasitos intracelulares pela via do TNF- $\alpha$ /ERO. Ambos os capítulos (II e III)

mostraram a importância dos estudos envolvendo os compostos isolados de fontes naturais, além de estruturalmente favoráveis para o processo de biotransformação fúngica, permitindo a obtenção de compostos biologicamente mais ativos.

**Palavras-chave:** citocromo P450; fungos filamentosos; hidroxilação; apoptose.

Gonçalves, Manoela Daisele. **Trypanocidal activity of grandiflorenic acid and leishmanicidal activity of biotransformed analogues of kaurenoic acid**. 2021. 195 p. Thesis (PhD in Chemistry, Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-UNICENTRO) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The diterpenes kaurenoic acid (KA) and grandiflorenic acid (GFA), secondary metabolites isolated from *Sphagneticola trilobata* (Asteraceae), are described in the literature as antiparasitic, antimicrobial and antioxidant, in addition to having favorable structures for the biotransformation process by filamentous fungi. Leishmaniasis, a disease caused by parasitic protozoa of the *Leishmania* genus, is transmitted to humans through the bite of the sand fly insect. They present several clinical manifestations, ranging from the cutaneous to the visceral form, and are dependent on the host's immune response and the parasite species. Chagas disease is caused by parasitic protozoa of the genus *Trypanosoma cruzi*, which are transmitted to the mammal via the vector via the feces of infected triatomines. The clinical course is divided into two main phases, acute and chronic. Treatment for both diseases, despite having reported therapeutic efficiency, have high toxicity to the patient, causing several side effects, in addition to parasitological resistance, often resulting in treatment discontinuation. Thus, the search for compounds that have a therapeutic approach for the treatment of these diseases has been increasingly investigated. In chapter II, the KA biotransformation process was performed by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and two kauran analogues were obtained, 7-hydroxykaurenoic acid (7OHKA) and 7,9-dihydroxykaurenoic acid (7,9OHKA). From the *in silico* study, the compounds showed favorable characteristics according to the proposed rules analyzed. In the MTT cytotoxicity assay on J774A.1 murine macrophages, treatment with KA (10 to 200  $\mu$ M) reduced cell viability from 50  $\mu$ M in 72 h and 96 h, while 7OHKA and 7,9OHKA did not differ from the group control ( $p > 0.05$ ), except at the highest concentrations tested (150 and 200  $\mu$ M). In the assay of proliferation kinetics of promastigote forms of *L. amazonensis*, 7OHKA, at 72 and 96 h times, it reduced viability by 70 %, and for 7,9OHKA, this reduction was observed after 96 h of treatment. Thus, the analogues obtained showed favorable characteristics for the study as potential candidates in the search for new antiprotozoan drugs. In chapter III, the effect of GFA on trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* was determined. The results showed that GFA treatment reduced the viability of trypomastigote forms, with morphological and ultrastructural changes in the treated parasites, an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial depolarization, accumulation of lipid bodies, presence of vacuoles was observed autophagic, phosphatidylserine exposure and plasma membrane damage. Furthermore, GFA reduced the number of amastigote forms per macrophage (J774A.1), without exhibiting toxicity in mammalian strains (J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, THP-1 and AMJ2-C11). Therefore, GFA increased TNF- $\alpha$  levels and reduced IL-6 levels in infected macrophages. Thus, treatment with GFA acted on trypomastigote forms through a mechanism similar to apoptosis and elimination of intracellular parasites via the TNF- $\alpha$ /ROS pathway. Both chapters (II and III) showed the importance of studies involving compounds isolated from natural sources, in addition to being structurally favorable for the fungal biotransformation process, allowing the obtainment of more

biologically active compounds.

**Key words:** cytochrome P450, filamentous fungi, hydroxylation, apoptosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> -	A) Flor da <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Prusk B) Planta inteira .....	27
<b>Figura 2</b> -	Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas .....	29
<b>Figura 3</b> -	Exemplos de diterpenos acíclicos e cíclicos .....	30
<b>Figura 4</b> -	Principais subclasses de diterpenos .....	31
<b>Figura 5</b> -	Representação estrutural A) KA e B) GFA .....	32
<b>Figura 6</b> -	Biotransformação do diterpeno caurano 7 $\beta$ -acetoxi-ent-caur-16-eno pelo fungo <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	36
<b>Figura 7</b> -	Principais biotransformações do diterpeno caurano ent-15 $\beta$ -18-dihidroxi-caur-16-eno pelo fungo <i>Mucor plumbeus</i> .....	37
<b>Figura 8</b> -	Morfologia de <i>Cunninghamella elegans</i> .....	39
<b>Figura 9</b> -	Ciclo biológico do protozoário <i>Leishmania</i> sp .....	44
<b>Figura 10</b> -	Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose .....	47
<b>Figura 11</b> -	Estrutura do ent-3 $\alpha$ -hidroxi-caur-16-en-18-ol .....	48
<b>Figura 12</b> -	Ciclo biológico do protozoário transmissor da DC .....	51
<b>Figura 13</b> -	Estrutura dos fármacos de referência utilizados para o tratamento da DC .....	54
<b>Figura 14</b> -	Estrutura do ácido 3-angeloiloxi-ent-caur-16-en-19-óico .....	54
<b>Figura 15</b> -	A) Ácido ent-15 $\beta$ -seneciil-oxi-caur-16-en-19-óico e B) ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-óico .....	55

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b> -	Processo de biotransformação esquematizado .....	88
<b>Figura 2</b> -	Estrutura do KA isolado da <i>S. trilobata</i> .....	94
<b>Figura 3</b> -	Espectro de RMN 13C do KA (1) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 60 ppm .....	96
<b>Figura 4</b> -	Espectro de RMN 1H do KA (1) (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 2,8 ppm .....	97
<b>Figura 5</b> -	Espectro de RMN 13C e ampliação da região de 0 a 60 ppm do composto biotransformado 7OHKA (2) (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD, $\delta$ em ppm) .....	100

<b>Figura 6</b> -	Espectro de RMN 1H do composto biotransformado 7OHKA (2) (400 MHz, CD3OD, $\delta$ em ppm).....	101
<b>Figura 7</b> -	Estrutura do 7OHKA obtido pelo processo de biotransformação .	101
<b>Figura 8</b> -	Efeito $\gamma$ -gauche observado em 7OHKA.....	104
<b>Figura 9</b> -	Ampliação do espectro 2D HSQC demonstrando os principais acoplamentos do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	105
<b>Figura 10</b> -	Ampliação do espectro 2D HMBC do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	106
<b>Figura 11</b> -	Ampliação do espectro 2D COSY do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	107
<b>Figura 12</b> -	Mapa de correlações dos RMN 2D (HMBC, COSY e NOESY) do 7OHKA.....	108
<b>Figura 13</b> -	Espectro de RMN 13C do composto biotransformado 7,9OHKA (3) (100 MHz, CD3OD, $\delta$ em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 60 ppm .....	109
<b>Figura 14</b> -	Espectro de RMN 1H do composto biotransformado 7,9OHKA (3) (400 MHz, CD3OD, $\delta$ em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 2,5 ppm .....	110
<b>Figura 15</b> -	Estrutura do 7,9OHKA obtido pelo processo de biotransformação .....	111
<b>Figura 16</b> -	Ampliação do espectro 2D HSQC demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	113
<b>Figura 17</b> -	Ampliação do espectro 2D HMBC demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD.....	114
<b>Figura 18</b> -	Representação estrutural dos análogos obtidos a partir da biotransformação do KA.....	116
<b>Figura 19</b> -	Viabilidade de células J774A.1 tratadas com KA, 7OHKA e 7,9OHKA.....	121
<b>Figura 20</b> -	Efeito do tratamento com os compostos biotransformados 7OHKA e 7,9OHKA na viabilidade de <i>L. amazonensis</i> .....	122
<b>Figura A1</b> -	Ampliação do espectro 2D NOESY do 7OHKA obtido pela	

	biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	147
<b>Figura A2</b> -	Ampliação do espectro 2D COSY demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	148
<b>Figura A3</b> -	Ampliação do espectro 2D NOESY demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	149

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b> -	Resumo gráfico .....	150
<b>Figura 2</b> -	GFA inibe a viabilidade de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e induz alterações morfológicas .....	163
<b>Figura 3</b> -	GFA induz alterações ultraestruturais em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	165
<b>Figura 4</b> -	Avaliação dos níveis totais de ERO, potencial de membrana mitocondrial e corpos lipídicos em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com GFA IC50 e 2x IC50 por 24 h .....	166
<b>Figura 5</b> -	GFA induz a formação de vacúolos autofágicos, exposição à fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	167
<b>Figura 6</b> -	Efeito de GFA em J774A.1 infectado com <i>T. cruzi</i> .....	108
<b>Figura 7</b> -	GFA modula os níveis de citocinas e ERO em macrófagos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	109

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1** - Classificação taxonômica da *Sphagneticola trilobata*.....26
- Tabela 2** - Principais hidroxilações observados a partir da biotransformação do KA utilizando os fungos *C. echinulata* e *A. phoenicis* .....38
- Tabela 3** - Classificação taxonômica de *C. elegans*.....39

### CAPÍTULO II

- Tabela 1** - Esquema do fracionamento para a 2° CLV da fração 9:1 em gradiente crescente de polaridade e volume de solvente utilizado .....83
- Tabela 2** - Esquema do fracionamento para a 3° CLV da fração 7 (80:20) em gradiente crescente de polaridade e volume de solvente utilizado .....84
- Tabela 3** - Composição do meio Czapeck utilizado no processo de biotransformação fúngica por *C. elegans*.....87
- Tabela 4** - Dados de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz; δ em ppm) e <sup>1</sup>H (400 MHz, δ em ppm) do KA (1) comparando com os dados da literatura em CDCl<sub>3</sub>.....95
- Tabela 5** - Junção dos frascos obtidos da CC do extrato biotransformado de KA .....99
- Tabela 6** - Dados dos espectros 1D de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz; δ em ppm) e <sup>1</sup>H) (400 MHz, δ em ppm, J em Hz), Dept 135 (+, - e Ausente) e Dept 90 (+ e Ausente) do 7OHKA (2) comparando com os dados da literatura em CD<sub>3</sub>OD .....102
- Tabela 7** - Dados dos espectros de 2D correlacionados com os dados dos espectros RMN 1D de <sup>13</sup>C (100 MHz; δ em ppm) e <sup>1</sup>H (400 MHz, δ em ppm, J em Hz), do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD .....107
- Tabela 8** - Dados dos espectros 1D de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz; δ em ppm) e <sup>1</sup>H (400 MHz, ; δ em ppm), Dept 135 (+, - e Ausente) e Dept 90 (+ e Ausente) do 7,9OHKA (3) comparando com os dados da literatura em CD<sub>3</sub>OD .....111

<b>Tabela 9</b> - Dados dos espectros de 2D correlacionados com os dados dos espectros RMN 1D de <sup>13</sup> C (100 MHz; δ em ppm) e <sup>1</sup> H (400 MHz, δ em ppm, J em Hz), do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da <i>S. trilobata</i> em CD3OD .....	114
<b>Tabela 10</b> - Dados in silico para o tratamento com KA (1), 7OHKA (2) e 7,9OHKA (3).....	117
<b>Tabela 11</b> - ADME/TOX e avaliação de parâmetro farmacológico previstos dos compostos KA, 7OHKA e 7,9OHKA utilizando a ferramenta admetSAR.....	118
<b>Tabela 12</b> - CC50 (72 e 96 h), IC50 (72 e 96 h) e IS do KA, 7OHKA e 7,9OHKA .....	124

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b> - IC50, CC50 e IS do GFA.....	169
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7OHKA	Ácido 7 $\alpha$ -hidroxi-ent-caur-16-en-19-óico
79OHKA	Ácido 7 $\alpha$ -9 $\alpha$ -diidroxi-ent-caur-16-en-19-óico
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
Amb	Anfotericina B
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
BDA	Batata Dextrose Ágar
BZ	Benznidazol
C <sup>13</sup>	Carbono 13
Caco-2	células de adenocarcinoma de cólon humano
CC <sub>50</sub>	Concentração Citolóxica 50 %
CC	Cromatografia Clássica
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
COSY	do inglês <i>Correlation Spectroscopy</i>
CR	do inglês <i>Complement Receptor</i>
CYP	do inglês <i>Cytochrome P450</i>
d	duplete
dd	duplo duplete
DC	Doença de Chagas
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FNRs	do inglês <i>Fibronectin receptors</i>
FUEL	Herbário da Universidade Estadual de Londrina
GFA	Ácido Grandiflorênico
H <sup>1</sup>	Hidrogênio 1

H-Acc/nON	Grupos aceptores de ligação de hidrogênio
H-Don/nOHNH	Grupos doadores de hidrogênio
hERG	do inglês human <i>Ether-à-go-go-Related Gene</i>
HMBC	do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC <sub>50</sub>	do inglês <i>The Half maximal Inhibitory concentration</i>
IL	Interleucina
IgG	Imunoglobulina de classe G
IS	Índice de Seletividade
KA	Ácido Caurenóico
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmaniose Mucocutânea
Log P	Lipofilicidade
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
<i>m</i>	multiplete
MDC	Monodansilcadaverina
MET	Microscopia eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg <sup>2+</sup>	íon de Magnésio
MHz	Mega hertz
mL	mililitro
MRs	do inglês <i>mannose receptor</i>
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NFX	Nifurtimax
NLRP12	do inglês NLR <i>Family Pyrin Domain Containing 12</i>
NO	do inglês <i>Nitric Oxide</i>
NOESY	do inglês <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C-Reativa
pf	Ponto de Fusão
PM	Peso molecular
ppm	partes por milhão

R5	Regra dos cinco
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA <sub>m</sub>	do inglês <i>Ribonucleic Acid Messenger</i>
s	Singleto
SBF	Soro Bovino Fetal
SI	do inglês <i>Selective Index</i>
s/	Singleto Largo
TGF-β	do inglês <i>Transforming growth Factor Beta</i>
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	do inglês <i>Tumor necrosis Factor alpha</i>
TPSA	Área de superfície polar molecular
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	23
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
1.1	PRODUTOS NATURAIS .....	24
1.2	<i>SPHAGNETICOLA TRILOBATA</i> .....	25
1.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS .....	28
1.4	DITERPENOS .....	29
1.5	BIOTRANSFORMAÇÃO .....	32
1.5.1	Biotransformação Fúngica .....	33
1.5.2	Biotransformação Fúngica em Diterpenos Cauranos .....	35
1.5.2.1	Biotransformação a partir de <i>Cunninghamella Elegans</i> .....	38
1.6	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS .....	41
1.6.1	Leishmaniose .....	41
1.6.1.1	Ciclo biológico .....	43
1.6.1.2	Tratamento convencional .....	44
1.6.1.3	Atividade leishmanicida dos diterpenos cauranos .....	47
1.6.2	Doença de Chagas .....	49
1.6.2.1	Ciclo biológico .....	49
1.6.2.2	Tratamento convencional .....	52
1.6.2.3	Atividade tripanocida de diterpenos cauranos .....	54
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	57
2.1	OBJETIVO GERAL .....	57
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>CAPÍTULO II – ATIVIDADE LEISHMANICIDA IN VITRO DE DITERPENOS CAURANOS OBTIDOS POR MEIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO POR <i>CUNNINGHAMELLA ELEGANS</i></b> .....	77
	RESUMO .....	78
	ABSTRACT .....	79

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>82</b>
2.1	PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO .....	82
2.2	PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO....	82
2.3	PROCESSO DE RECRISTALIZAÇÃO .....	84
2.4	IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO.....	84
2.5	BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA .....	85
2.5.1	Micro-organismo e Manutenção .....	85
2.5.2	Inóculo.....	85
2.5.3	Biotransformação em Escala Semipreparativa.....	86
2.5.4	Filtração e Extração.....	87
2.5.5	Procedimento de Biotransformação em Escala Preparativa .....	88
2.5.6	Filtração e Extração.....	89
2.6	ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO DITERPENO CAURANO BIOTRANSFORMADO .....	89
2.7	ESTUDO IN SÍLICO DO 7OHKA E DO 7,9OHKA .....	90
2.8	ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS.....	91
2.8.1	Manutenção das Formas Promastigotas de <i>L. amazonenses</i> .....	91
2.8.2	Cultivo Celular .....	91
2.8.3	Cinética de Proliferação do 7OHKA e do 7,9OHKA .....	92
2.8.4	Viabilidade de Macrófagos Murinos.....	92
2.8.5	Índice de Seletividade dos Compostos Biotransformados.....	93
2.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	93
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>94</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO CAURENÓICO ISOLADO DAS PARTES AÉREAS DE <i>SPHAGNETICOLA TRILOBATA</i> POR RMN DE 1H E 13C.....	94
3.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE 1D E 2D DOS ANÁLOGOS OBTIDOS A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO KA POR <i>C. ELEGANS</i> .....	97

3.2.1	Caracterização Estrutural por RMN de 1D e 2D do Análogo 2 (7OHKA) Obtido pela Biotransformação do KA por <i>C. elegans</i> .....	99
3.2.2	Caracterização Estrutural por RMN de 1D e 2D do Análogo 3 (7,9OHKA) Obtido pela Biotransformação do KA por <i>C. elegans</i> .....	109
3.3	ANÁLISE IN SÍLICO DOS COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS.....	116
3.4	COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS EXERCEM BAIXA CITOTOXICIDADE EM J774A.1 .....	120
3.5	CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADAS COM 7OHKA E 7,9OHKA.....	122
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>126</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>127</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>147</b>
	APÊNDICE I .....	147
	APÊNDICE II.....	148
	APÊNDICE III.....	149
	<b>CAPÍTULO III – ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO ISOLADO DE SPHAGNETICOLA TRILOBATA CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI: TOXICIDADE, MECANISMOS DE AÇÃO E IMUNOMODULAÇÃO</b> .....	<b>150</b>
	RESUMO .....	149
	ABSTRACT .....	152
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>153</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>155</b>
2.1	MATERIAL VEGETAL .....	155
2.2	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO (GFA).....	155
2.3	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> .....	156

2.3.1	Parasitos <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	156
2.3.2	Atividade Anti-Tripomastigotas .....	156
2.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	157
2.3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	157
2.3.5	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em Forma Tripomastigotas .....	158
2.3.6	Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	158
2.3.7	Detecção de Acúmulo de Corpos Lipídios.....	158
2.3.8	Quantificação de Vacúolos Autofágicos .....	159
2.3.9	Determinação da Exposição à Fosfatidilserina.....	159
2.3.10	Determinação da Integridade da Membrana Celular .....	159
2.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E IMUNOMODULADORA <i>IN VITRO</i> EM MACRÓFAGOS INFECTADOS .....	160
2.4.1	Cultura Celular.....	160
2.4.2	Ensaio de Citotoxicidade .....	160
2.4.3	Ensaio Anti-Amastigota .....	161
2.4.4	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por Macrófagos.....	161
2.4.5	Produção de Citocinas .....	162
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	162
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	163
3.1	GFA INIBE A VIABILIDADE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> ....	163
3.2	GFA INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> .....	164
3.3	GFA PROMOVE A PRODUÇÃO DE ERO, DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> .....	166
3.4	GFA INDUZ A FORMAÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS, EXPOSIÇÃO À FOSFATIDILSERINA E PERDA DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> .....	167
3.5	GFA NÃO ALTERA A VIABILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES .....	167
3.6	GFA INDUZ A ELIMINAÇÃO DE AMASTIGOTA INTRAMACROFÁGICA DE <i>T.</i> <i>CRUZI</i> .....	168

3.7	GFA MODULA OS NÍVEIS DE CITOCINAS E ERO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> .....	169
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	171
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	175
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	176
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	177

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são metabólitos secundários presentes nas raízes, caules, folhas, frutos, sementes, vegetais e outras partes das plantas com uma ampla variedade estrutural que medeia as interações entre as plantas e seu ambiente (GERVAZONI et al., 2020). A utilização de plantas na medicina popular está enraizada nas culturas de todo o mundo, sendo comprovada historicamente a fim de promover a manutenção da saúde humana, seja para aliviar ou tratar diversas doenças (ZANK et al., 2015). Em muitos países, sua utilização constitui como método alternativo à medicina convencional, principalmente em regiões mais pobres ou onde não há acesso ao serviço de saúde (CADENA-GONZÁLEZ; SØRENSEN; THEILADE, 2013).

A denominação planta medicinal pode ser dada a qualquer planta que exerça função terapêutica, ao ser administrada por qualquer via ou forma, ao homem ou animal. O início da utilização através de infusões, unguentos, compressas e loções com potencial curativo pelo homem foi de forma intuitiva e experimental, visto que eram inexistentes as informações sobre as doenças (PETROVSKA, 2012; RIBEIRO NETO et al., 2020).

De acordo com a literatura, mais de 300.000 espécies de plantas são relatadas como plantas medicinais, porém apenas 15 % foram exploradas a fim de obter seus componentes bioativos isolados. Sabe-se que uma característica importante das plantas é a alta capacidade em gerar uma série de metabólitos durante seu crescimento e vida, ressaltando sua extrema importância na descoberta de novos compostos químicos biologicamente ativos (LOWE et al., 2021). Deve-se ressaltar ainda que os produtos naturais, além de atuarem como tratamento e como fonte de novos fármacos, também podem levar a descobertas e melhorias na compreensão de alvos terapêuticos ou até mesmo de vias envolvidas na patogênese de doenças (BRAHMACHARI, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), a partir de 1978, reconheceu os benefícios das plantas medicinais para a humanidade, classificando-as como a melhor e mais completa fonte de medicamentos (RIBEIRO NETO et al., 2020). Em 2004, o Brasil passou a avaliar os fitoterápicos utilizando os mesmos padrões de segurança que os medicamentos convencionais. Em 2006, o Ministério da Saúde implementou a

Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006), e em 2009 publicaram a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Renuis), relatando 71 plantas com diferentes propriedades terapêuticas utilizadas como medicamentos fitoterápicos disponíveis na assistência farmacêutica básica em todo o país. (BRASIL, 2009). No entanto, nenhuma das espécies relatadas apresentam indicação como antiparasitário em especial antileishmania e antitripanossoma. As doenças parasitárias são a principal fonte de doenças tanto em humanos quanto em animais e resultam em perdas econômicas significativas. Para novos e eficazes tratamentos para combater a parasitose, muitos grupos de pesquisa têm procurado utilizar produtos naturais de plantas com potencial como compostos terapêuticos.

Considerada a maior família de angiosperma, as Asteraceae têm sido comumente utilizadas no tratamento de diversas doenças antiparasitárias desde a antiguidade, conforme atesta a literatura clássica (revisado em PANDA; LUYTEN, 2018)). Essa família representa cerca de 10 % da flora mundial, possuem cerca de 1.700 gêneros com mais de 35.000 espécies catalogadas, sendo classificadas em 13 subfamílias apresentando 44 tribos (MANDEL et al., 2019).

As Asteraceae são cosmopolitas, podendo ser encontradas em todos os continentes com exceção da Antártica. São consideradas importantes constituintes da flora local, pois a maioria das espécies possuem distribuição restrita (FUNK et al., 2009; ROQUE; BAUTISTA, 2008). Classificadas como monofiléticas, sendo facilmente reconhecidas pela inflorescência do tipo capítulo, possuem maturação centrípeta, anteras fundidas por seus bordos laterais formando um tubo envolvendo o estilete e o estigma (sinanteria); um cálice altamente modificado em pápus e o fruto do tipo cipsela (FUNK et al., 2009; ROQUE; BAUTISTA, 2008). A *Sphagneticola trilobata* anteriormente classificada como *Wedelia paludosa* e *Acmella brasiliensis*, é um dos principais exemplos de plantas pertencentes a família Asteraceae, podendo ser encontrada em diversas regiões brasileiras assim como em outros países (SOUSA et al., 2018).

## 1.2 SPHAGNETICOLA TRILOBATA

A *S. trilobata* (L.) Pruski (sin. *W. trilobata*, *W. paludosa*, *Acmella brasiliensis*), popularmente conhecida como margaridão e pseudo-arnica, é uma

planta herbácea, estolonífera e perene. Possui folhas simples, trilobadas, opostas cruzadas e inflorescência do tipo capítulo isolado de coloração amarela. Seu caule é prostrado com enraizamento ao longo dos nós, com ramos ascendentes de coloração verde ou avermelhada, revestidos por pilosidade capazes de formar densas populações (FERNANDES; RITTER, 2009) (Figura 1).

A floração desta Asteraceae ocorre durante todo ano, porém nos meses de maio e novembro acontecem com maior intensidade no Brasil (SOUSA et al., 2018). Nativa de regiões tropicais, no Brasil ela pode ser encontrada em todas as regiões, principalmente em estados como, Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo (LANG et al., 2017). Estudos mostram que a *S. trilobata* apresenta um potencial alelopático significativo, sendo capaz de influenciar na inibição do crescimento de plantas vizinhas (ZHANG; HU; HU, 2013). Abaixo a tabela 1 apresenta a classificação científica desta planta.

**Tabela 1:** A classificação taxonômica da *Sphagneticola trilobata*

Classificação científica	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Tribo	Heliantheae
Gênero	<i>Sphagneticola</i>
Espécies	<i>Sphagneticola trilobata</i>

**Fonte:** (SIBBR, 2020)

**Figura 1: A)** Flor da *Sphagneticola trilobata* (L.) Prusk **B)** Planta inteira

**A)**



**B)**



**Fonte:** (SCHWIRKOWSKI, 2011)

O emprego dessa planta com finalidade ornamental ocorre devido ao seu alto índice de enfolhamento, sendo utilizada principalmente em paisagismo devido sua alta tolerabilidade a umidade excessiva, alagamentos ou seca, contudo não se limita a essa utilização (SOUSA et al., 2018).

Estudos etnofarmacológicos demonstraram que a utilização dessa planta está relacionada ao tratamento de processos inflamatórios em geral, e na medicina popular ela é considerada um remédio para tratamento de feridas infecciosas, úlceras, câibras musculares, inchaços e doenças reumáticas (DAI et al., 2013; LI et al., 2007; MALDINI et al., 2009b) Algumas frações do extrato bruto da *S. trilobata* demonstraram ação antibacteriana (BLOCK et al., 1998), hepatoprotetora (MA et al., 2013; MALDINI et al., 2009b) cicatrização de feridas (BALEKAR et al., 2012b), anti-inflamatória (MALDINI et al., 2009), tripanocida (BATISTA; CHIARI; DE OLIVEIRA, 1999), antifúngica (SARTORI et al., 2003) e hipoglicemiante (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

De acordo com a literatura, os estudos fitoquímicos realizados demonstram que essa planta possui altas concentrações de compostos terpênicos, flavonóides e esteroides além da ausência de alcalóides. Diferentes partes da *S. trilobata*, apesar de apresentarem similaridade entre seus compostos, apresentam diferenças na sua

constituição química (BACCARIN et al., 2009).

Dentre os principais constituintes desta planta, destacam-se os diterpenos cauranos, sendo o ácido caurenóico (KA) (do inglês *ent-kaur-16-en-19-oic acid*) e ácido grandiflorênico (GFA) (do inglês *ent-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid*) os compostos majoritários (BACCARIN et al., 2009; BATISTA et al., 2009). Apesar da similaridade entre as estruturas químicas destes compostos, elas se diferem por uma dupla ligação de hidrogênio (BATISTA et al., 2009, 2013).

### 1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Os processos metabólicos das plantas são definidos como um conjunto de reações químicas essenciais, importantes no desenvolvimento das plantas, podendo ser divididos em metabólitos primários, relacionados ao crescimento e desenvolvimento da espécie, e metabólitos secundários, que aumentam a probabilidade de sobrevivência do organismo. Os metabólitos secundários desempenham funções protetoras contra fungos, bactérias e vírus, contra o ataque de herbívoros e a alta exposição à luz ultravioleta (DEWICK, 2015; WINK, 2003). Atualmente foram relatados mais de 200.000 metabólitos secundários de plantas em geral na literatura (HARTMANN, 2007). Fatores como sazonalidade, temperatura, distribuição hídrica, ritmo circadiano, altitude, poluição atmosférica e radiação ultravioleta são capazes de influenciar na síntese de metabólitos secundários, influenciando na produção de compostos (DEWICK, 2015).

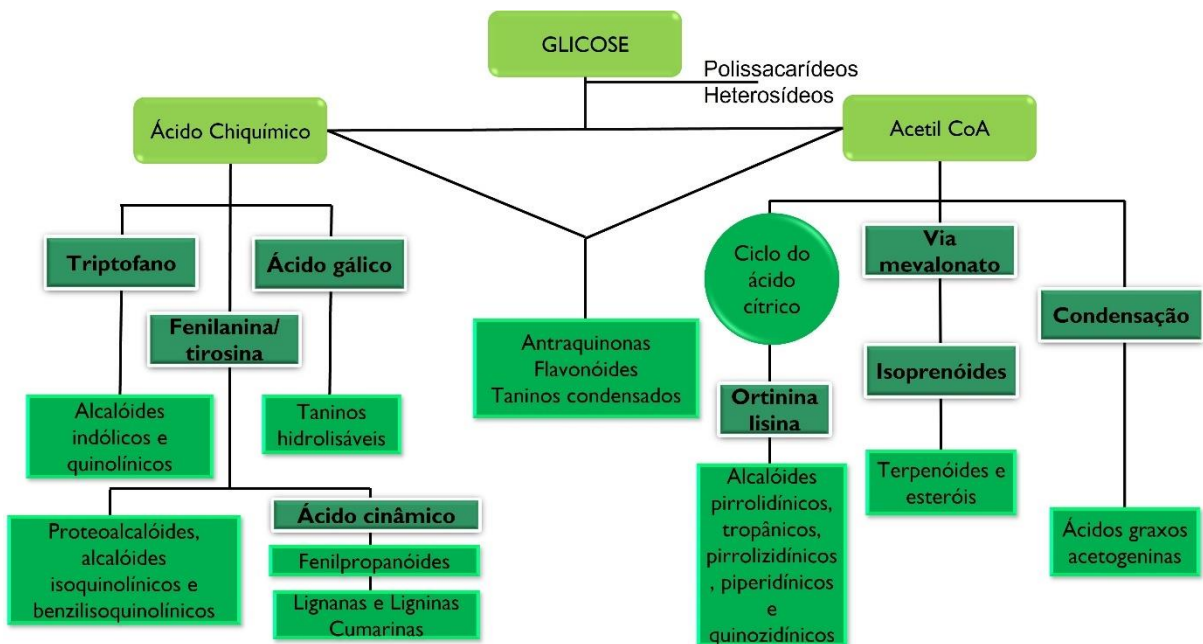
As diversas funções associadas aos metabólitos secundários no desenvolvimento e proteção das plantas está diretamente relacionado com seu potencial efeito biológico em mamíferos. Por exemplo, metabólitos secundários relacionados ao processo de defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos microbianos podem apresentar atividade sem causar toxicidade celular, sendo úteis no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos em humanos (PUSZTAHELYI; HOLB; PÓCSI, 2015). Estudos mostram que compostos relacionados a estes metabólitos podem ter ação no sistema nervoso central, contribuindo no desenvolvimento de antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou até mesmo anestésicos, uma vez que apresentem atividade neurotóxica em animais herbívoros (AHARONI; GALILI, 2011; HARTMANN, 2007).

Os metabólitos secundários são originados a partir do metabolismo da

glicose, precursor proveniente do metabolismo primário da planta, através da via de dois metabólitos principais, o ácido chiquímico e a via do Acetil CoA (Figura 2) (DEWICK, 2015).

De acordo com sua composição química, os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, fenóis e alcaloides (WINK, 2003). A partir das vias do acetato-mevalonato (ou ácido mevalônico) e do metileritriol fosfato são produzidas as substâncias terpênicas que são formadas pela junção de unidades isoprênicas pentacarbonadas formando cadeias lineares ou anéis. As cadeias podem ser formadas por 5 átomos de carbono (hemiterpênica), 10 átomos de carbono (monoterpenos), 15 átomos de carbono (sesquiterpenos), 20 átomos de carbono (diterpeno), 30 átomos de carbono (triterpeno), 40 átomos de carbono (carotenos) e até unidades maiores (politerpenos) (DEWICK, 2015).

**Figura 2:** Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas



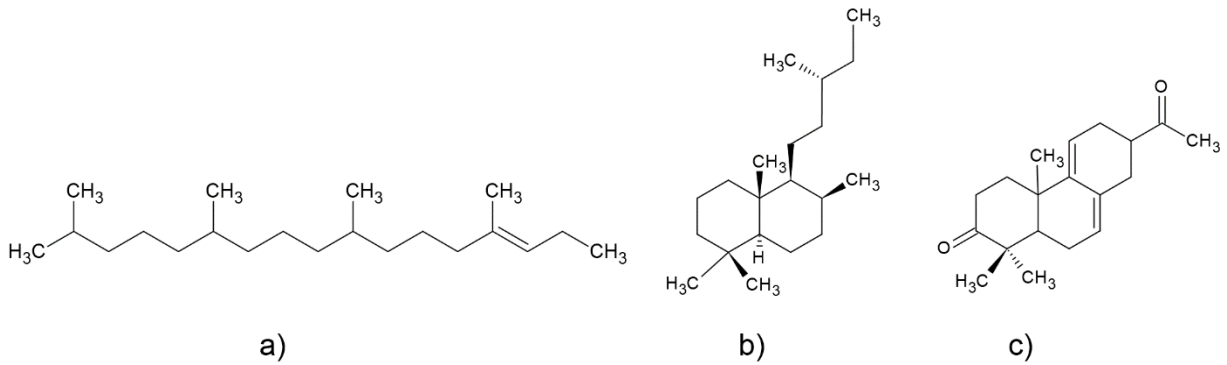
**Fonte:** Adaptado de (SANTOS, 2007)

#### 1.4 DITERPENOS

Formados por uma extensa classe de compostos estruturalmente diversificados, os diterpenos (derivados de 4 unidades de isopreno para formar uma espinha dorsal de 20 carbonos), podem apresentar-se de forma acíclica ou cíclica. Os

diterpenos acíclicos de cadeia aberta são bastante raros, como por exemplo, o fitol, enquanto os diterpenos cíclicos podem ser constituídos de um ou mais anéis, divididos principalmente em bi e tricíclicos (Figura 3) (LIN et al., 2016).

**Figura 3:** Exemplos de diterpenos acíclico e cíclicos



**Legenda:** a) fitol; diterpenos bicíclicos, b) labdano; e diterpenos tricíclicos, c) podocarpanos.

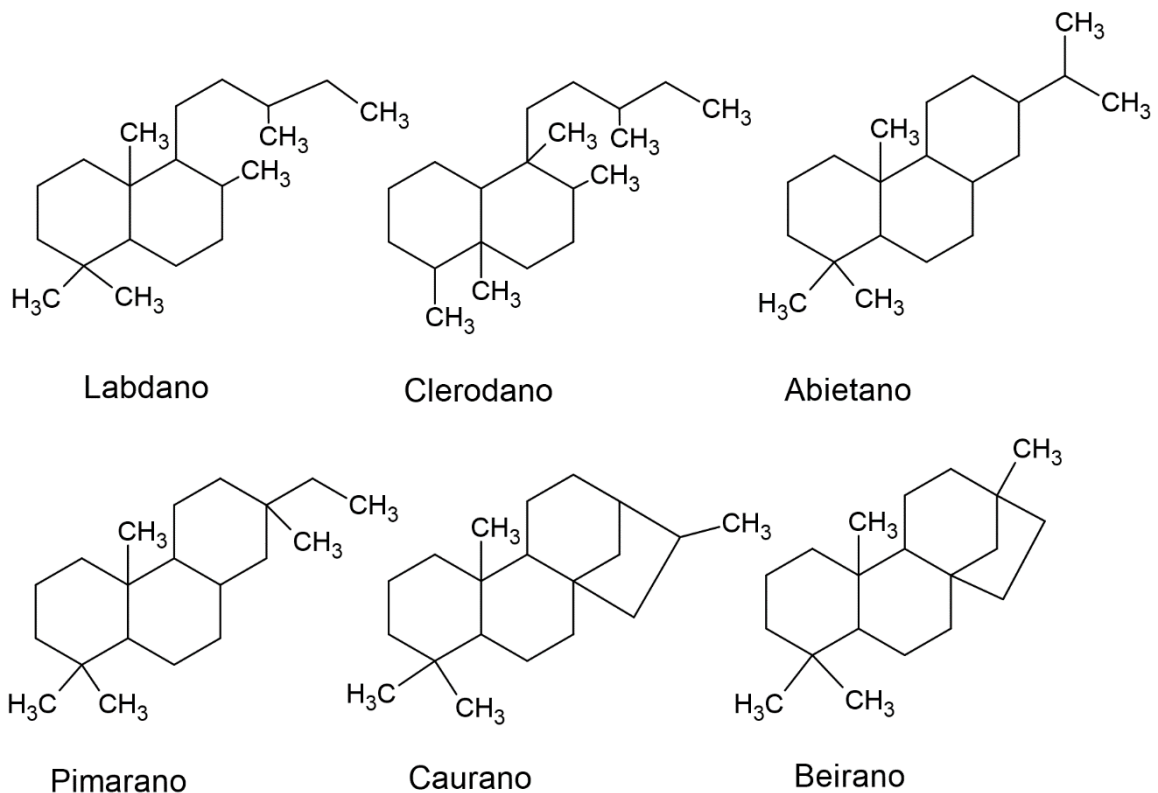
**Fonte:** Adaptado de (LIN et al., 2016).

Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos geralmente não voláteis, com alto grau de ciclização e diversas atividades biológicas relacionadas como propriedades citotóxicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias, além de serem identificados como princípio ativo em alguns medicamentos tradicionais (VASAS; HOHMANN, 2014). (HANSON, 2001; ZANK et al., 2015). Os diterpenos de ocorrência natural são encontrados na forma polioxigenada, ou seja, podem apresentar 1) grupos hidroxila, geralmente esterificado por ácidos alifáticos/aromáticos ou por álcoois; 2) grupos formil e carbonil, que freqüentemente reagem com grupos hidroxil a fim de formar porções hemiacetais ou acetais; ou 3) com grupos carboxila, que podem formar ésteres ou lactonas a partir das reação com álcoois. Além disso, podem ser encontrados diterpenoides com estruturas em anel abertos e reorganizados. Essa classe de terpenos é sintetizada exclusivamente através da rota via mevalonato (HANSON, 2015; LIN et al., 2016)

Essa classe de compostos são geralmente encontrados em plantas e fungos, no entanto, alguns foram descritos em insetos (*Nasutitermes exitiosus*) (BLUM; BRAND, 1972) e organismos marinhos (*Heterobranch molluscs*) (AVILA, 2020). Sua classificação ocorre de acordo com o número e os padrões de ciclização de suas estruturas (DEWICK, 2015). Esses metabólitos são divididos em subclasses, que se diferenciam de acordo com seu esqueleto principal, sendo os diterpenos

cíclicos mais comuns os labdanos, clerodanos, abietanos, pimaranos, cauranos, e beiranos (Figura 4) (MACIEL et al., 2006). A partir da diversidade estrutural apresentada pelos diterpenos, assim como a ampla gama de atividades biológicas, as pesquisas resultando na identificação de novos compostos que apresentam eficácia biológica, vem aumentando (GONZÁLEZ, 2015; VASAS; HOHMANN, 2014)

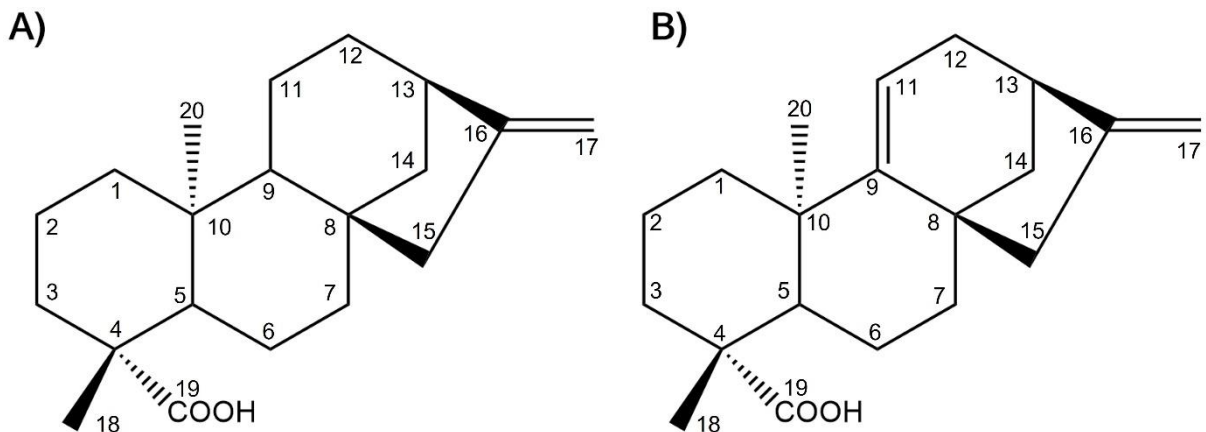
**Figura 4:** Principais subclasses de diterpenos



**Fonte:** Próprio Autor

De acordo com a literatura, os diterpenos do tipo caurano são compostos considerados biologicamente ativos, onde destacam-se o ácido caurenóico (KA, ácido ent-caur-16-en-19-oico) e o ácido grandiflorênico (GFA, ácido ent-caur-9(11),16-dien-19-oico) (Figura 5), que possuem atividades descritas na literatura como antiparasitária (BORTOLETI et al., 2018; KIAN et al., 2018; MIRANDA et al., 2015), antimicrobiana (MARTINS et al., 2018; PFEIFER BARBOSA et al., 2019) e antioxidante (KUNDU; DEY; BANDYOPADHYAY, 2014; VILLA-RUANO; LOZOYA-GLORIA; PACHECO-HERNÁNDEZ, 2016), elevando o interesse pelo estudo dessas moléculas.

**Figura 5:** Representação estrutural **A)** KA e **B)** GFA



**Fonte:** Próprio Autor

KA e GFA são diterpenos cauranos que possuem estruturas consideradas menos funcionalizadas, no entanto podem ser encontrados em quantidade significativa na *S. trilobata* quando comparados a outros cauranos de estrutura mais complexa. Apesar da atividade biológica já descrita, esses compostos possuem estruturas favoráveis ao processo de biotransformação com a finalidade de obter derivados mais funcionalizados e até mesmo biologicamente mais ativos.

### 1.5 BIOTRANSFORMAÇÃO

Reações de biotransformação são modificações estruturais em compostos naturais e sintéticos catalisadas a partir de sistemas biológicos como fungos, bactérias, leveduras ou enzimas isoladas a partir desses modelos (PERVAIZ et al., 2013). As vantagens na utilização destes catalisadores biológicos estão relacionadas ao seu rápido crescimento, sistema multienzimático de fácil formação, oxidação de sítios C-H remotos e inativos em uma molécula complexa, além de realizar a catálise de novas reações regio e estereoseletivas (BASTOS et al., 2007). As modificações químicas a partir desse sistema geralmente acarretam na formação de novas estruturas e compostos, podendo resultar em compostos quimicamente estáveis com atividade farmacológica desejada, uma vez que ocorre a possibilidade de prever as reações metabólicas mais favorecidas (SMITHA; SINGH; SINGH, 2017).

Outras vantagens da biotransformação estão relacionadas a versatilidade, condições e velocidade das reações. O tempo de reação é variável de acordo com o

fungo utilizado, no entanto, ocorrem em condições brandas (pH entre 5 e 8, temperatura entre 20 e 40 °C) e são frequentemente utilizados solvente aquosos (SOUSA et al., 2017).

A utilização de fungos no processo de biotransformação é mais frequente, visto que o cultivo realizado em meio apropriado de células íntegras de microrganismos vivos, apresenta um custo reduzido além da possibilidade da resolução de misturas racêmicas (obtendo um composto em maior quantidade) e também a formação de uma mistura de produtos biotransformados, obtendo compostos com variedade estrutural (DO NASCIMENTO; CONCEIÇÃO; DE OLIVEIRA SILVA, 2018).

Por serem mediadas por sistemas biológicos, as reações de biotransformação são consideradas sensíveis as condições experimentais. Assim, variações na composição do meio, temperatura, pH, condições de incubação, agitação/aeração das culturas, fase de desenvolvimento do organismo que atuará como biocatalisador, entre outros fatores, devem ser considerados. A padronização dos aspectos experimentais devem ser realizados a fim de se obter os melhores resultados (LECH; BEND, 1980).

### 1.5.1 Biotransformação Fúngica

Existem diversas aplicabilidades para a biotransformação, desde biodegradação de poluentes (JAÉN-GIL et al., 2019; XIAO; KONDO, 2020) a estudo direcionado ao metabolismo envolvendo compostos bioativos, a fim de descobrir novas estruturas candidatas a fármacos, e o desenvolvimento da segurança desses novos compostos (AMADIO; GORDON; MURPHY, 2010; ARAKAWA et al., 2013). A partir do século XX houve um maior direcionamento das pesquisas para os estudos de biotransformação fúngica devido a necessidade de obtenção de novas estruturas químicas de interesse farmacêutico, além de reduzir os custos na síntese dessas estruturas. Até hoje a biotransformação é considerada uma estratégia biotecnológica economicamente acessível (LIMA et al., 2019).

Alguns modelos microbianos são classicamente utilizados em estudos de metabolismo, destacando-se os fungos filamentosos endofíticos, que podem ser encontrados no solo ou associados a vegetais saudáveis em uma relação simbiótica (KATOCH; SALGOTRA; SINGH, 2014).

A biotransformação a partir de fungos filamentosos contam com um complexo sistema enzimático, capaz de catalisar uma série de reações como, hidroxilação, desidroxilação, redução, O-metilação, O-demetilação, glicosilação, acetilação e conjugação (CAO et al., 2015). A utilização de microrganismos inteiros nesse processo acarreta vantagens frente a síntese convencional, desde a obtenção de compostos em condições ótimas de operação a um sistema simples e de baixo custo, gerando menos impacto ambiental (BOAVENTURA; LOPES; TAKAHASHI, 2004). Além disso, pode ser empregado para o estudo do metabolismo de compostos, e isto ocorre devido a metabolização de xenobióticos baseadas no princípio de que são organismos eucariotos com aparato enzimático semelhante aos mamíferos, capazes de reproduzir com facilidade as enzimas do complexo citocromo P450 encontrada principalmente no fígado e no epitélio do intestino (ABOURASHED; CLARK; HUFFORD, 1999; LAKE; PRICE, 2013).

Com isso, a biotransformação fúngica tornou-se útil como modelo de estudos farmacológicos, avaliação de toxicidade de novos compostos e dos metabólitos produzidos. A vantagem em relação ao modelo animal está relacionada com a facilidade de manipulação, maior diversidade de produção de metabólitos, produção em escala industrial de estruturas de interesse, além da resolução quanto à enantiosseletividade durante as reações de biotransformação (BORGES; BONATO; PUPO, 2011).

Entre os fungos filamentosos, as espécies do gênero *Cunninghamella* são conhecidos por serem modelos capazes de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos de maneira regio e estereosseletiva, mimetizando os sistemas enzimáticos de mamíferos, considerado importante em processos de biotransformação (ASHA; VIDYAVATHI, 2009) São sapróbias encontradas geralmente no solo e em outros substratos orgânicos, provenientes de áreas mediterrâneas e subtropicais sendo raramente isolados em regiões menos temperadas (DUBE; KUMAR, 2017). Sua caracterização morfológica apresenta micélio cenocítico ramificado, com esporângio, contendo um esporo único, sobre vesículas que podem ou não ser diferenciadas em apicais e laterais, possuindo crescimento rápido (em torno de 4 dias), com coloração algodoadada branca a acizentada (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; NGUYEN; CHOI; LEE, 2017; WEITZMAN; CRIST, 1980). Também são caracterizadas pela sua alta sensibilidade, onde variações relacionadas a fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultura ou

diferentes condições de temperatura e umidade podem interferir no seu fenótipo (POTHULURI et al., 1992).

Algumas espécies de *Cunninghamella*, possuem sistemas de monooxigenase do citocromo P450, análogos aos de mamíferos e enzimas do metabolismo de drogas de fase II, capazes de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos usando mecanismos de biotransformação de fase I (oxidativos) e de fase II (conjugativos). A atividade do citocromo P450 desse fungo também é responsável pela hidroxilação, N-oxidação e N-desmetilação de diversos antidepressivos tricíclicos (PISKA et al., 2016).

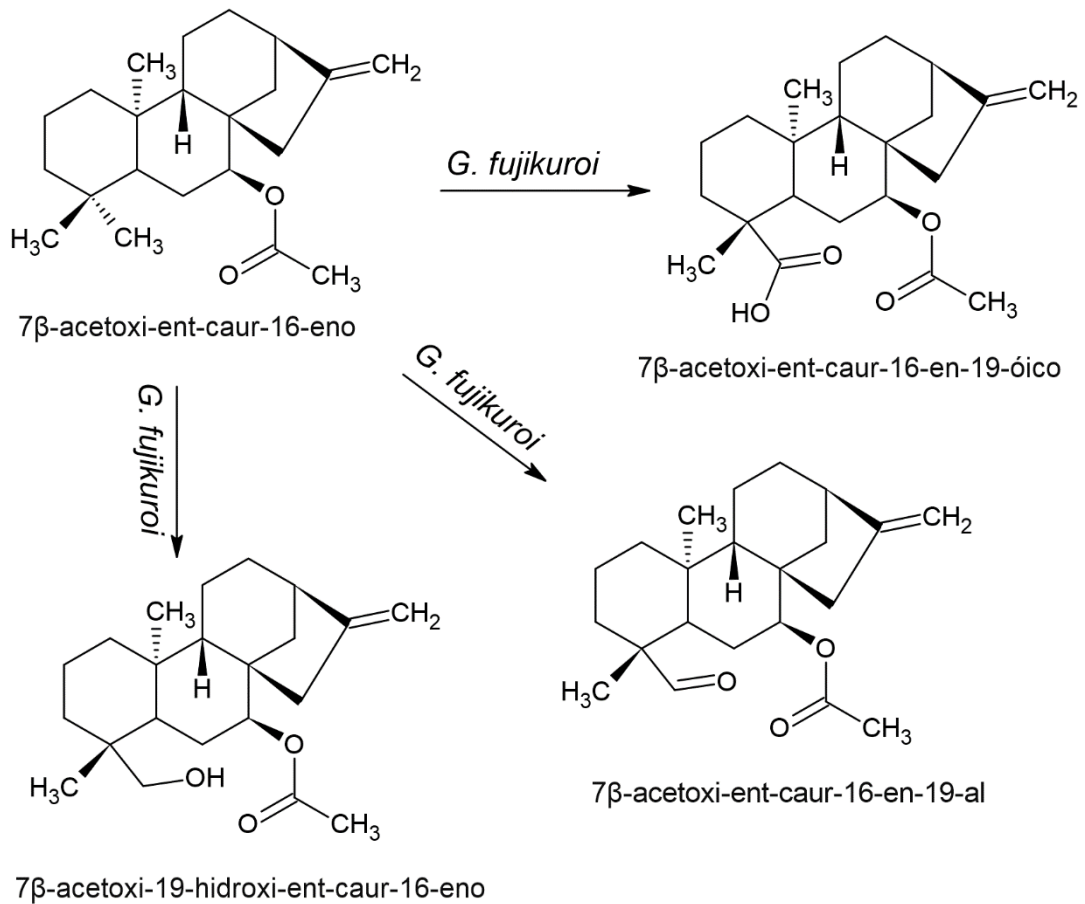
Desta forma, são amplamente utilizados no processo de biotransformação, incluindo de diterpenos, que são compostos que apresentam diversas atividades biológicas, sendo promissores como material de partida na obtenção de novos compostos (VENISETTY; CIDDI, 2005).

#### 1.5.2 Biotransformação Fúngica de Diterpenos Cauranos

A literatura mostra que os análogos obtidos através do processo de biotransformação em diterpenos cauranos menos funcionalizados isolados de fontes vegetais, apresentaram resultados biológicos promissores quando comparados ao material de partida. Entre as reações envolvidas no processo de transformações por microrganismos em cauranos, a de hidroxilação é a mais comum. Takahashi et al., (2014) mostraram que a presença de hidroxilas adicionais no esqueleto podem aumentar a atividade biológica quando comparados aos seus precursores apolares.

Fraga e colaboradores (2012), apresentaram a biotransformação do 7 $\beta$ -acetoxi-ent-caur-16-eno por *Gibberella fujikuroi* levando a obtenção do ácido 7 $\beta$ -acetoxi-ent-caur-16-en-19-óico além de outros derivados, mostrando a eficiência do fungo no processo de obtenção de análogos, auxiliando no estudo sobre o processo metabólico deste fungo (Figura 6).

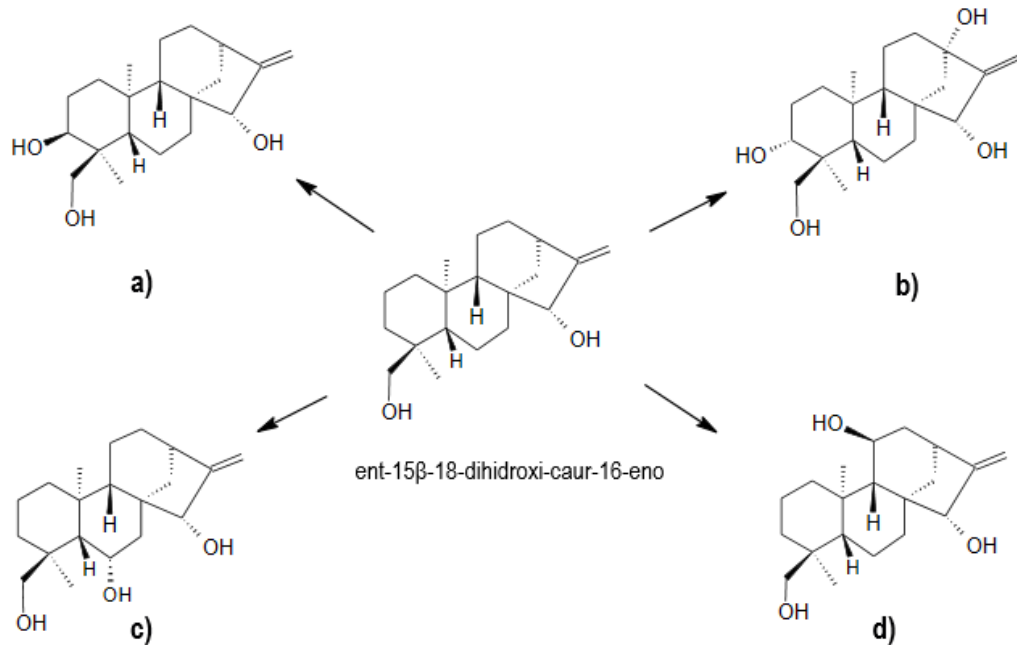
**Figura 6:** Biotransformações do diterpeno caurano 7 $\beta$ -acetoxi-ent-caur-16-eno pelo fungo *Gibberella fujikuroi*



**Fonte:** Adaptado de (FRAGA et al., 2012)

Em um estudo anterior, os autores mostraram a capacidade do fungo *Mucor plumbeus* em hidroxilar diversas posições do caurano ent-15 $\beta$ -18-dihidroxi-caur-16-eno conhecido por candidiol, formando os metabólitos ent-3 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,18-trihidroxi-caur-16-eno (a), ent-13 $\beta$ ,15 $\beta$ ,18-trihidroxi-caur-16-eno (b), ent-6 $\beta$ ,15 $\beta$ ,18-trihidroxi-caur-16-eno (c) e ent-11 $\alpha$ ,15 $\beta$ ,18-trihidroxi-caur-16-eno (d) representados na figura 7 (FRAGA et al., 2010).

**Figura 7:** Principais biotransformações do diterpeno caurano ent-15 $\beta$ -18-dihidroxi-caur-16-eno pelo fungo *Mucor plumbeus*

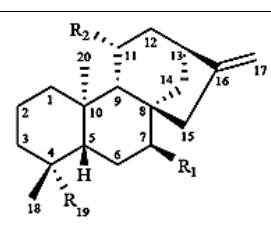


**Fonte:** Adaptado de (FRAGA et al., 2010).

A biotransformação por *Aspergillus niger* do diterpeno ácido ent-caur-16-en-19-oico um dos principais constituintes das raízes de *Viguiera hypargyrea*, uma planta medicinal mexicana, mostrou a capacidade do fungo em realizar dihidroxilações regio e estereoseletivas nas posições 1 $\alpha$ , 7 $\beta$  e 11 $\alpha$  desse composto (MARQUINA et al. 2009).

As hidroxilações frequentemente observadas em diterpenos cauranos ocorre principalmente nos carbonos 7 e 11 nas posições  $\alpha$  ou  $\beta$ , uma característica comum das biotransformações microbianas. *C. echinulata* e *A. phoenicis* foram capazes de introduzir grupos hidroxila na estrutura química do ácido ent-caurenóico nas posições C-7 e C-11 (Tabela 2), apresentando rendimentos significativos na hidroxilação estereosseletiva em 7 $\alpha$ . No modelo de esquistossomose experimental, os análogos obtidos através do processo de biotransformação, o ácido 7 $\alpha$ -acetoxi-ent-caur-16-en-19-óico foi o mais ativo, reduzindo o número de ovos e causando mortalidade *in vitro* de 100 % dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* dentro de 24 horas de tratamento quando comparado a xxxxx mostrando uma melhor resposta do composto biotransformado(OLIVEIRA et al., 2020).

**Tabela 2:** Principais hidroxilações observadas a partir da biotransformação do KA utilizando os fungos *C. echinulata* e *A. phoenicis*

Material de partida	Fungo	Análogos obtidos pelo processo de biotransformação
 <p>R = COOH; R1 = H; R2 = H Ácido caurenóico (KA)</p>	<p><i>C. echinulata</i> e <i>A. phoenicis</i></p>	<p>R = COOH; R1 = OH; R2 = H Ácido Ent-7<math>\alpha</math>-hidroxi-caur-16-en-19-óico</p>
		<p>R = COOH; R1 = OH; R2 = OH Ácido 7<math>\alpha</math>,11<math>\beta</math>-dihidroxi-ent-caur-16-en-19-óico</p>
		<p>R = COOH; R1 = H; R2 = H Ácido ent-caur-9 (11), 16-dien-19-óico</p>
		<p>R = COOH; R1 OCOCH<sub>3</sub>; R2 = H Ácido 7<math>\alpha</math>-acetoxi-ent-caur-16-en-19-óico</p>

**Fonte:** Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2020)

#### 1.5.2.1 Biotransformação a partir de *Cunninghamella elegans*

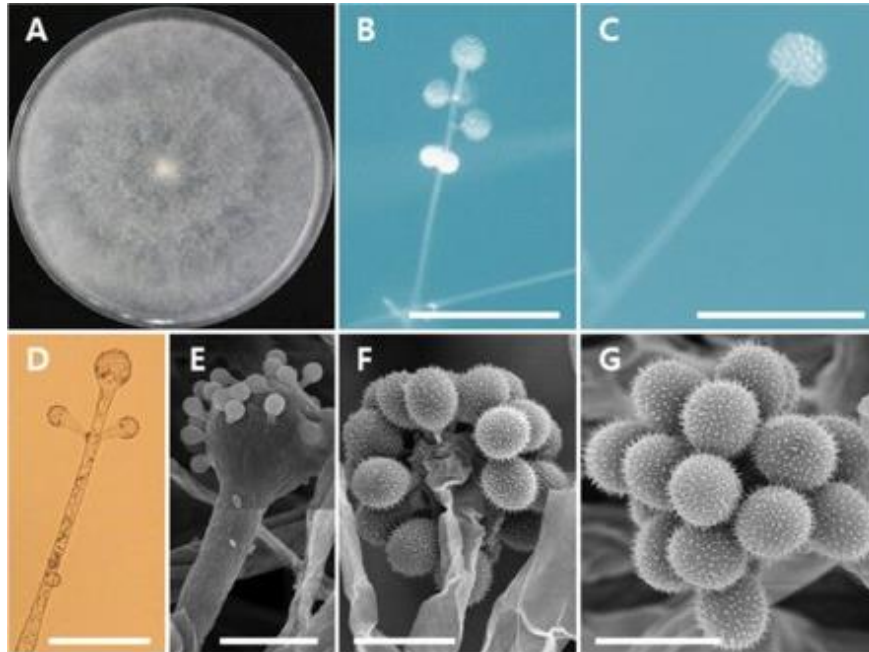
Os estudos utilizando *C. elegans* (Figura 6) no processo de biotransformação tem sido investigado por sua capacidade em produzir uma diversificada gama de metabólitos por mimetizar o metabolismo humano, além de degradar um amplo espectro de xenobióticos, atuando principalmente na oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tornando-os em metabólitos mais solúveis em água para alcançar uma melhor eliminação do corpo humano (SULTAN et al., 2013; WATANABE; KUZHIUMPARAMBIL; FU, 2018; ZAWADZKA et al., 2015).

O metabolismo de fármacos em humanos pode ocorrer nos pulmões, rins, intestino, coração, sangue e principalmente no fígado, com o envolvimento de muitas enzimas hepáticas, especialmente da família do citocromo P450 (CYP) (ZHU et al., 2016). As enzimas metabolizadoras produzidas por esse fungo são capazes de realizar biotransformação de fase I e de fase II.

*C. elegans* possui pelo menos um gene que codifica uma enzima CYP intimamente relacionada com a família CYP51 denominado CYP509A1, auxiliando na compreensão do seu mecanismo de biotransformação e reações de desintoxicação catiônica (WANG et al., 2000). A morfologia e classificação taxonômica de *C. elegans*

está representado a seguir (Figura 8, Tabela 3).

**Figura 8:** Morfologia de *C. elegans*



**Legenda:** A) Colônias em ágar; B e C) Esporangióforos com esporangiola (microscópio óptico); D) Esporangióforos com vesículas; E) Esporangiola jovem formada em uma vesícula de esporangióforo (Microscopia eletrônica de varredura [MEV]); F e G) Esporangiola com espinhos (MEV) (escala: B) 200  $\mu\text{m}$ , C) 100  $\mu\text{m}$ , D) 50  $\mu\text{m}$ , E-G) 10  $\mu\text{m}$ ).

**Fonte:** (NGUYEN; CHOI; LEE, 2017)

**Tabela 3:** Classificação taxonômica de *C. elegans*

Classificação científica	
Reino	Fungi
Filo	Zygomycota
Ordem	Mucorales
Gênero	<i>Cunninghamella</i>
Espécie	<i>Cunninghamella elegans</i>

**Fonte:** (SIBBR, 2020)

Nascimento e colaboradores (2019) mostraram a biotransformação de nove cumarinas usando *C. elegans* ATCC 10028b e *A. brasiliensis* ATCC 16404 destacando a obtenção de análogos químicos com alta seletividade, a partir da

utilização de condições amenas (pH neutro, temperatura ambiente e pressão atmosférica), apresentando uma hidroxilação seletiva em um carbono não ativado.

Outro estudo mostrou que *C. elegans* foi capaz de degradar a quinolina com alta eficiência transformando em dois novos derivados hidroxilados, a 2-hidroxiquinolina e 3-hidroxiquinolina. O fungo também foi capaz de modular a composição de ácidos graxos e o perfil fosfolipídico devido a ruptura na estabilidade da membrana (FELCZAK et al., 2016).

Chen e colaboradores (2017) realizaram a transformação microbiana do ácido ciperenóico, um dos principais sesquiterpenos isolados da *Croton crassifolius*, a partir do *C.elegans* AS 3.2028. Nesse estudo obtiveram 5 novos produtos hidroxilados que foram capazes de reduzir significativamente a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) *in vitro* em células HepG2 e MCF-7.

Ácidos triterpenos pentacíclicos isolados da *Boswellia serrata* apesar de apresentarem atividades biológicas significativas, dados farmacocinéticos mostraram que possuem baixa absorção, além de rápido metabolismo, o que limita sua biodisponibilidade. Assim, Xin et al., (2013) realizaram a biotransformação dos ácidos 11-ceto-boswélico e acetil-11-ceto-boswélico utilizando *C. elegans* a fim de melhorar os dados farmacocinéticos previamente estudados, obtendo 4 novos compostos, caracterizados como ácido 7 $\beta$ -hidroxi-11-ceto-boswélico, 7 $\beta$ , ácido 30-dihidroxi-11-ceto-boswellico (2), 7 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxi-3-acetil-11-ceto-boswélico e ácido 7 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 21 $\beta$ -trihidroxi-3-acetil-11-ceto-boswélico.

A biotrasformação do sesquiterpeno (+)-esclareolídeo com *C. elegans* (NRRL 1392) resultou na formação de novos metabólitos 2 $\alpha$ -hidroxisclareolídeo, 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diidroxisclareolídeo e  $\beta$ -hidroxi-8-episclareolídeo além de outros metabólitos conhecidos. Os autores realizaram a elucidação estrutural desses metabólitos com base em dados espectrais e estudos espectroscópicos comparativos com material de partida (CHOUDHARY et al., 2004).

Ma e colaboradores (2007) realizaram a biotransformação do metoprolol utilizando cinco espécies de *Cunninghamella* sp. (*C. elegans* AS 3.156, *C. elegans* AS 3.2028, *C. echinulata* AS 3.2004, *C. blakesleeana* AS 3.153 e AS 3.910), onde observaram a similaridade dos metabólitos obtidos com os biotransformados em mamíferos, além da obtenção de dois novos compostos de reação de N-desalquilação do metoprolol e um conjugado glicosídeo de O-desmetil-metoprolol, destacando o alto rendimento na obtenção desses compostos.

Assim, o uso de sistemas microbiológicos como *C. elegans*, permite a produção de metabólitos a partir de uma via economicamente interessante, além de farmacologicamente promissora. No entanto, mais estudos são necessários com o intuito de melhorar estruturalmente os compostos já estudados, aumentando suas características farmacocinéticas e respostas biológicas.

## 1.6 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas estão diretamente relacionadas à pobreza e afetam mais de um bilhão de pessoas nos países em desenvolvimento. As necessidades de tratamento não atendidas causam alta mortalidade e incapacidade, causando graves consequências sociais e econômicas. Embora coordenado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), várias organizações filantrópicas, governos nacionais e a indústria farmacêutica têm feito esforços para melhorar a situação, o controle dessas doenças ainda é inadequado e extremamente difícil nos dias de hoje. A falta de medicamentos seguros, eficazes e acessíveis é um fator-chave de contribuição (WENG; CHEN; WANG, 2018).

De acordo com a OMS atualmente 20 doenças são consideradas como negligenciadas: úlcera de Buruli; dengue e chikungunya; cromoblastomicose e outras micoses profundas; dracunculíase (doença do verme da Guiné); equinococose; trematodíases de origem alimentar; tripanossomíase humana africana (doença do sono); lepra (doença de Hansen); filariose linfática; micetoma; oncocercose (cegueira dos rios); raiva, sarna e outros ectoparasitos; esquistossomose; envenenamento por picada de cobra; helmintíases transmitidas com sujeira; teníase/cisticercose; tracoma; boubá e outras treponematoses endêmicas além da leishmaniose e a Doença de Chagas (WHO, 2021a)

### 1.6.1 Leishmaniose

Caracterizada como uma doença antropozoonótica, a leishmaniose é causada por protozoários unicelulares pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, sua transmissão aos hospedeiros mamíferos ocorre através do

repasto sanguíneo de diferentes espécies de insetos vetores flebotomíneos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Considerada uma doença infecciosa, a leishmaniose integra a lista das 20 doenças tropicais negligenciadas e o segundo lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias mais frequentes no mundo, sendo endêmica em 100 países e afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a OMS, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob o risco de infecção (WHO, 2020).

As manifestações clínicas que caracterizam a doença constituem a forma visceral, cutânea, mucocutânea, difusa e disseminada, nas quais o aspecto clínico e a evolução da doença são dependentes principalmente da espécie e virulência do parasito envolvido, e do sistema imunológico do hospedeiro (resposta imune, susceptibilidade, estado nutricional, genética e idade). Nas Américas, o acometimento cutâneo é conhecido como leishmaniose tegumentar americana (LTA) (DESJEUX, 2004). (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DATASUS; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017).

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, com acometimento sistêmico. As manifestações clínicas da doença são caracterizadas principalmente por febres irregulares, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Após a recuperação, os pacientes podem desenvolver a forma cutânea, que requer um longo e oneroso tratamento (DESJEUX, 2004). Quando não tratada após o aparecimento dos sintomas, pode ser fatal em até 90 % dos casos (BALAÑA-FOUCE et al., 2019).

A forma clínica mais frequente na LTA é a leishmaniose cutânea localizada (LC), caracterizada pela formação de úlcera única ou múltiplas na pele, que se iniciam no local de inoculação da picada do vetor. As características iniciais da lesão são o aparecimento de eritema, edema e após um período variável de incubação desenvolve-se uma úlcera típica apresentando bordas elevadas, contornos regulares e fundo granuloso, podendo ou não apresentar exsudato purulento (ANVERSA et al., 2018; GONZÁLEZ et al., 2008; MAGILL, 2005).

A forma clínica mucosa (LM) é caracterizada pela capacidade do parasito de se disseminar via hematogênica e/ou linfática para mucosa nasal e/ou oral do paciente. Esta forma está associada a espécie de *L. braziliensis*. As lesões apresentam caráter destrutivo atingindo mucosas, lábios, palato e cartilagens do septo nasal. Essas lesões na mucosa podem surgir imediatamente após a forma cutânea

ou até mesmo anos após sua cicatrização, provenientes de uma terapia inadequada (BERBERT et al., 2018). Uma característica que difere a LM, é que além de não evoluir para uma cura espontânea, os riscos de deformidade permanente no paciente são altos (BERBERT et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A leishmaniose cutânea difusa é uma variante rara da LC, acomete pacientes que apresentam deficiência na resposta imune celular aos antígenos do parasitos do genero *Leishmania*. Os pacientes apresentam lesões não cicatrizantes, desenvolvimento de pápulas e nódulos não ulcerados com multiplicação parasitária descontrolada. A doença pode se disseminar por migração de macrófagos ou via linfática, ou seja, assumir um caráter crônico, persistindo por toda vida do paciente. São causadas pelas espécies: *L. amazonensis*, *L. aethiopica* ou *L. mexicana* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

O Brasil, se apresenta como um país que requer atenção nas medidas de tratamento e controle da doença, uma vez que possui alta incidência das três formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (DATASUS; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A LTA apresenta ampla distribuição geográfica no país, sendo o país considerado como a maior área endêmica devido a sua maior extensão territorial, com registros em todos os Estados brasileiros, enquanto a leishmaniose visceral (LV) é mais frequente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (WHO, 2019).

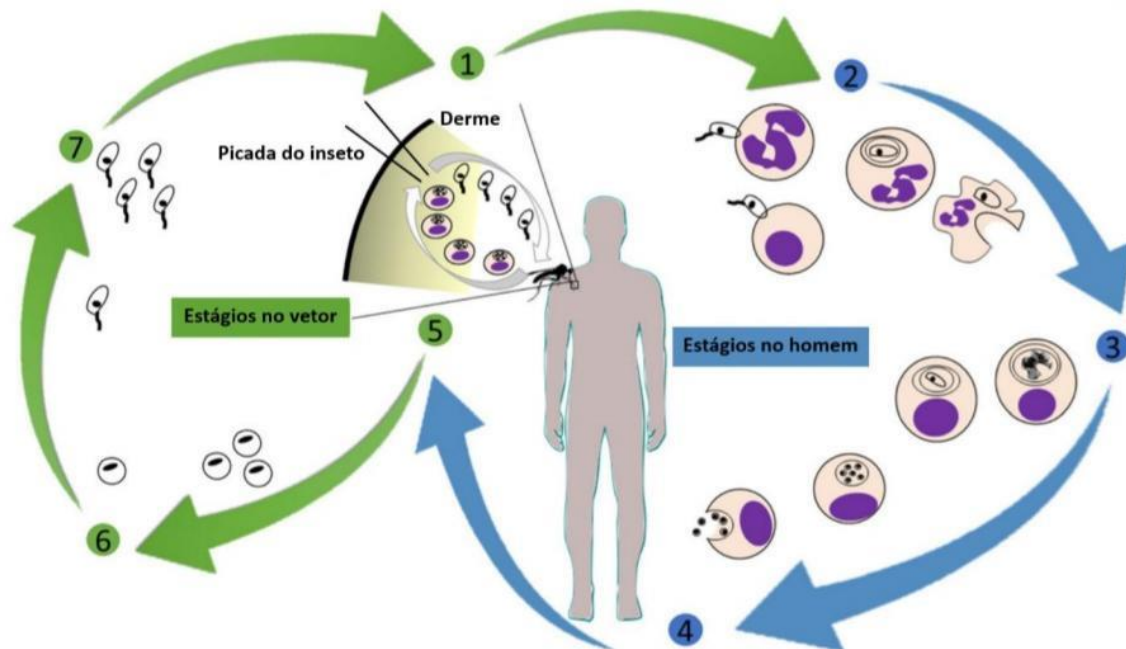
#### 1.6.1.1 Ciclo biológico

*Leishmania spp.* possui um ciclo biológico heteroxênico, ou seja, envolve um hospedeiro mamífero e um vetor, apresentando morfologia variável durante seu ciclo biológico (Figura 9) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O início da infecção em mamíferos ocorre durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas infectados com o protozoário. Após a flebotomia, as formas promastigotas metacíclicas são liberadas entrando na derme do hospedeiro, juntamente com a saliva do inseto a qual é capaz de induzir uma rápida infiltração de neutrófilos, além do recrutamento substancial de macrófagos residentes na pele (PETERS et al., 2008). Os neutrófilos são as primeiras células infectadas após a entrada dos parasitos na pele do hospedeiro. Essas células desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença e podem servir como um “cavalo de tróia”, enquanto os macrófagos são essenciais para o estabelecimento e amplificação da infecção (HANDMAN; BULLEN,

2002).

Uma vez fagocitadas por macrófagos, as formas promastigotas metacíclicas são internalizadas em vacúolos parasitóforos diferenciando-se em formas amastigotas, onde se proliferam por divisão binária até o rompimento da membrana macrófágica, liberando essas amastigotas que podem infectar novos macrófagos ou ser ingerida por uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (TEIXEIRA et al., 2013).

**Figura 9:** Ciclo biológico do protozoário transmissor da leishmaniose tegumentar americana



**Legenda:** 1) Durante o repasto sanguíneo, mosquitos flebotomíneos fêmeas inoculam formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro; 2) na derme do hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados por macrófagos; 3) no interior dos macrófagos, as formas promastigotas vão se diferenciar em formas amastigotas, multiplicando por divisão binária; 4) após a multiplicação, as formas amastigotas são liberadas após a lise celular; 5) o ciclo se completa quando outro flebotomíneo ingere fagócitos infectados durante o repasto sanguíneo; 6) no interior de seu intestino, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas; 7) os parasitos se multiplicam e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, migrando para a probóscide do inseto.

**Fonte:** Adaptado de (BORGHI et al., 2016)

#### 1.6.1.2 Tratamento convencional

Os fármacos N-metil-glucamina (Glucantime da Sanofi-Aventis

Farmacêutica), o estibogluconato de sódio (Pentostan da GlaxoSmithKline e Solustibosan da Bayer) e a miltefosina (Milteforan, da Virbac) são utilizados como tratamento de primeira escolha para a maioria das formas clínicas de leishmaniose por mais de sete décadas (PASSERO et al., 2018).

Nas últimas décadas, surgiram compostos genéricos aos medicamentos de primeira escolha, apresentando resultados equivalentes além de serem economicamente mais acessíveis, difundindo o uso de antimoniais pentavalentes. A taxa de cura clínica desses fármacos pode chegar a 80-100 %, promovendo uma rápida regressão do número de parasitos presentes nos tecidos e no sangue, sendo diretamente relacionada com as espécies infectantes de *Leishmania*, assim como o estado imunológico do paciente (PASSERO et al., 2018). O mecanismo de ação desses compostos ainda são pouco conhecidos, porém acredita-se que o antimônio pentavalente atue como uma pró-droga, sendo convertido em trivalente, sua forma ativa, no fígado, interferindo na  $\beta$ -oxidação tanto de ácidos graxos como glicólise do parasito, induzindo uma depleção de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Em contrapartida à eficiência terapêutica relatada, apresentam alta toxicidade ao paciente, causando diferentes efeitos adversos incluindo mialgia, artralgia, inapetência, náuseas, vômitos, sensação de plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, insônia, edema, aumento sérico das enzimas hepáticas, insuficiência renal aguda, pancreatite e cardiotoxicidade. Na maioria dos casos, a cura clínica não é acompanhada pela cura parasitológica, isso ocorre devido a resistência aos fármacos de primeira escolha, ou pelo abandono do tratamento pelos pacientes, uma vez que esses fármacos apresentam dificuldade na administração, que deve ser realizada em ambiente hospitalar por via endovenosa ou intramuscular. Outro fator que devemos salientar é o alto custo do tratamento (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; RATH et al., 2003).

Quando ocorre resistência parasitária ou contra-indicações aos medicamentos de primeira escolha, fármacos como anfotericina B (AmB), paramomicina e pentamidina são recomendados. No entanto, também apresentam reações adversas ao paciente além de um índice terapêutico menor quando comparados aos antimoniais (DA SILVA-LÓPEZ, 2010).

AmB é um fármaco antifúngico, que atua na morte do parasito a partir da ligação com o ergosterol de sua membrana formando poros e alterando sua permeabilidade, permitindo a saída de íons de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (MESA-ARANGO;

SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Os efeitos colaterais relacionados a esse medicamento estão relacionados a sua baixa seletividade, o que permite a ligação ao colesterol presente na membrana celular dos mamíferos (CZUB; BOROWSKI; BAGINSKI, 2007).

O primeiro e único fármaco de administração oral para o tratamento da leishmaniose é a miltelfosina. Atua como inibidores da biossíntese lipídica em cinetoplastídeos, e em *Trypanosoma cruzi* estudos mostraram a redução na concentração de fosfatidilcolina além de apresentar alta seletividade para o parasito (LIRA et al., 2001). No entanto além de apresentar alto custo, apresentam elevada incidência de toxicidade gastrointestinal, ocasionalmente toxicidade hepática, nefrotoxicidade e teratogenia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

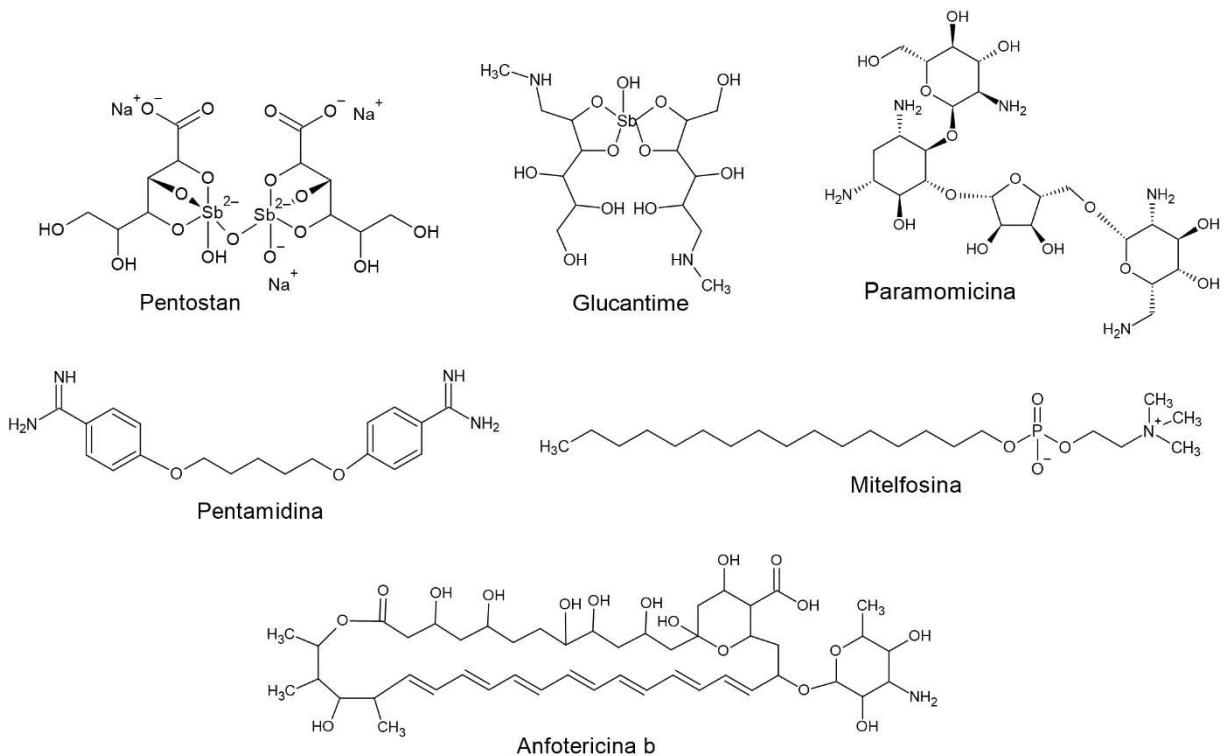
Paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol, para LV é utilizado na forma parenteral, enquanto na LC seu uso é realizado de forma tópica (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Seu mecanismo pode ser descrito pela sua ligação a subunidade ribossômica 30s, agindo através da interferência da síntese protéica de protozoários, podendo também levar a leitura incorreta do RNA mensageiro (RNAm). No entanto, não apresentou segurança devido sua necessidade de monitoramento das transaminases séricas, além de não apresentar informações necessárias sobre seu uso por gestantes (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Utilizada no início dos anos 80 para o tratamento da LV, a pentamidina desenvolvida como um análogo sintético da insulina é uma diamina aromática (BRAY et al., 2003). Seu mecanismo está relacionado com a sua competição com as poliaminas através de ligação aos ácidos nucleicos, ou até mesmo ligando-se ao DNA do cinetoplasto (SANDS; KRON; BROWN, 1985). De acordo com a literatura, esse fármaco pode causar alterações morfológicas como a ruptura mitocondrial, fragmentação de membrana e inibição da conversão de amastigotas em promastigotas em *L. mexicana* (SANDS; KRON; BROWN, 1985). A descontinuação do uso desse fármaco ocorreu por apresentar eficácia menor quando comparados aos efeitos adversos apresentados nos pacientes, como pancreatite, hipoglicemia, hipotensão, prolongamento do intervalo QT (duração da sístole elétrica ventricular) e hipercalemia (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

Pode-se observar que o tratamento para leishmaniose baseia-se em fármacos que são altamente tóxicos, apresentam graves efeitos adversos, dificuldade de administração além de apresentar elevado custo, dificultando o tratamento,

principalmente em países onde a leishmaniose é endêmica (RODRIGUES et al., 2015). Diante dessas dificuldades, fica evidente a necessidade de desenvolvimento de novos compostos que apresentem atividade leishmanicida e imunomoduladora mais eficaz e menor efeito colateral ao paciente. As estruturas dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose foram representadas abaixo.

**Figura 10:** Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose



**Fonte:** Adaptado de (RATH et al., 2003)

### 1.6.1.3 Atividade leishmanicida dos diterpenos cauranos

Diterpenos cauranos podem apresentar atividades biológicas promissoras, como atividade anti-inflamatória (XING et al., 2020), antimicrobiana (PFEIFER BARBOSA et al., 2019), antitumoral (PAGLIARA et al., 2020) e antiprotozoária (BATISTA; CHIARI; DE OLIVEIRA, 1999; SESSA et al., 2020).

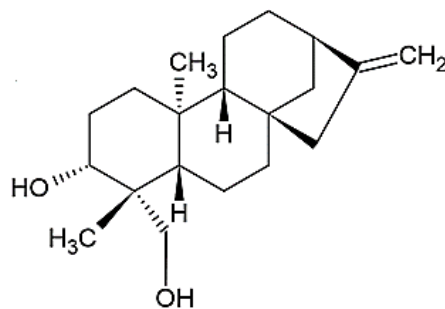
Com relação a leishmaniose, dos Santos et al., (2013) investigaram a atividade leishmanicida *in vitro* dos ácidos diterpênicos presentes na oleoresina de *Copaifera officinales*, além de pesquisarem possíveis alvos de sua ação *contra L. amazonensis*. Neste trabalho os autores verificaram que o KA (Figura 5A) apresentou maior atividade contra amastigotas axênicas, além de causar aumentos significativos

na permeabilidade da membrana plasmática e despolarização mitocondrial do protozoário. Miranda et al., (2015) demonstraram o efeito antiprotozoário *in vitro* e os mecanismos do KA isolado da *S. trilobata* contra *L. amazonensis*. De acordo com os autores, o composto além de apresentar efeito antileishmania direto sobre as formas promastigotas, foi capaz de reduzir o número intracelular de formas amastigotas e a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados. O tratamento com KA restabeleceu a produção de óxido nítrico (NO) de maneira constitutiva dependente de NO sintase<sup>-</sup> (cNOS<sup>-</sup>), subvertendo o mecanismo de escape depleção de NO de *L. amazonensis*. Além disso, o KA também induziu aumento na produção de IL-1 $\beta$  e expressão do componente ativador de inflamassoma NLRP12.

Bortoleti et al., (2018) avaliaram o efeito *in vitro* do GFA (Figura 5B), um diterpeno caurano isolado das raízes de *S. trilobata*, em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. De acordo com os resultados, os autores verificaram que esse diterpeno atua nas formas promastigotas por meio de um mecanismo semelhante à apoptose e nas formas amastigotas intracelulares, a ação foi dependente da imunomodulação com aumento nos níveis da interleucina (IL)-10 e do ferro total ligado à transferrina.

O diterpeno *ent*-caurano *ent*-3 $\alpha$ -hidroxi-caur-16-en-18-ol (Figura 11) isolado do extrato diclorometano das folhas de *Aldama discolor* foram testados *in vitro* contra *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *L. donovani* e *Plasmodium falciparum* e também a citotoxicidade contra células de mamíferos (linhagem L6). O composto apresentou atividade *in vitro* significativa contra *L. donovani*, além de não apresentar citotoxicidade em células L6 (NOGUEIRA et al., 2016a).

**Figura 11:** Estrutura do *ent*-3 $\alpha$ -hidroxi-caur-16-en-18-ol



**Fonte:** Adaptado de (NOGUEIRA et al., 2016a)

Como relatado acima, o estudo da atividade leishmanicida de compostos *ent*-cauranos são promissores porém ainda não foram totalmente explorados de acordo com seu potencial. Esses compostos se tornam muito interessantes para o processo de biotransformação, uma vez que suas atividades podem ser potencializadas por esse processo.

### 1.6.2 Doença de Chagas

Considerada como uma doença tropical negligenciada, a doença de Chagas (DC) é caracterizada como uma das zoonoses de maior impacto relacionada à saúde pública das Américas (WILLIAMS et al., 2020) causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, estejam infectadas pelo protozoário, no entanto, durante a última década, novos casos da DC foram identificados em áreas não endêmicas, devido à migração de indivíduos infectados ou até mesmo a infecção relacionada a viagens para áreas endêmicas (FRANCO-PAREDES et al., 2020; WHO, 2021b). Estima-se que haja no Brasil, atualmente, pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi*, mesmo com os avanços para a prevenção e controle da doença, ainda é considerada a quarta principal causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias, totalizando mais de 70 % das mortes entre 2000 e 2014. Em 2020, foram confirmados 146 casos da forma aguda da doença com uma letalidade de 2 % no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2021).

#### 1.6.2.1 Ciclo biológico

*Trypanosoma cruzi* é uma espécie de protozoário flagelado heteroxenica com alta diversidade genética e fenotípica, pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Euglenozoa, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (HAMILTON; STEVENS, 2010). No hospedeiro mamífero pode ser encontrados dois principais estágios do *T. cruzi*, a forma tripomastigota extracelular, e a forma amastigota intracelular, enquanto no intestino médio do inseto triatomíneo, encontram-se as formas epimastigotas, que no momento da infecção migram para o reto do inseto vetor diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicas infecciosas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Por apresentar vários estágios de desenvolvimento tanto em insetos vetores quanto em hospedeiros mamíferos, *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 12) (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). As formas tripomastigotas são flageladas, não possuem capacidade de realizar divisão celular, no entanto são extremamente infectantes, explicando sua capacidade de invadir qualquer célula nucleada. Após a invasão, os parasitos diferenciam-se em formas amastigotas com flagelo interiorizado (COURA, 2015). As formas amastigotas, multiplicam-se por divisões binárias dentro de diferentes tipos de célula, preferencialmente em células mesenquimais, assim após essa divisão, se diferenciam em formas tripomastigotas causando o rompimento da célula hospedeira alcançando a corrente sanguínea, o que permite a disseminação da infecção em outras células e tecidos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O curso clínico da DC em humanos, está dividida em duas principais fases: aguda e crônica. A infecção aguda pode ocorrer em pacientes de qualquer idade, sendo assintomática na maioria dos casos, quando ocorre nos primeiros anos de vida. Os sintomas que caracterizam essa fase são: febre, inflamação no local de inoculação, edema palpebral unilateral (quando o portal de entrada do parasito é a conjuntiva, denominado sinal de Romaña), linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Neste estágio, todos os tipos de células nucleadas são alvos potenciais para a infecção desenvolvendo a resposta imune, onde ocorre a redução da parasitemia, além da diminuição do número de parasitos nos tecidos, indicando o fim da fase aguda, que geralmente ocorre entre 4-8 semanas, porém diminui consideravelmente a partir dos 90 dias (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018). No entanto, não ocorre a completa eliminação parasitária, e a infecção de tecidos específicos, como os gânglios entéricos ou musculares, persistem indefinidamente durante a vida do hospedeiro (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A doença na sua forma mais grave (fase crônica) ocorre em menos de 1 a 5 % dos pacientes, e as manifestações presentes são miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (ORTIZ et al., 2019).

O elevado grau de variabilidade genética intra-específica do *T. cruzi*, está relacionada à distribuição geográfica, patogênese, características clínicas e resposta à terapia (WHO, 2016; YAMAGATA; NAKAGAWA, 2006).

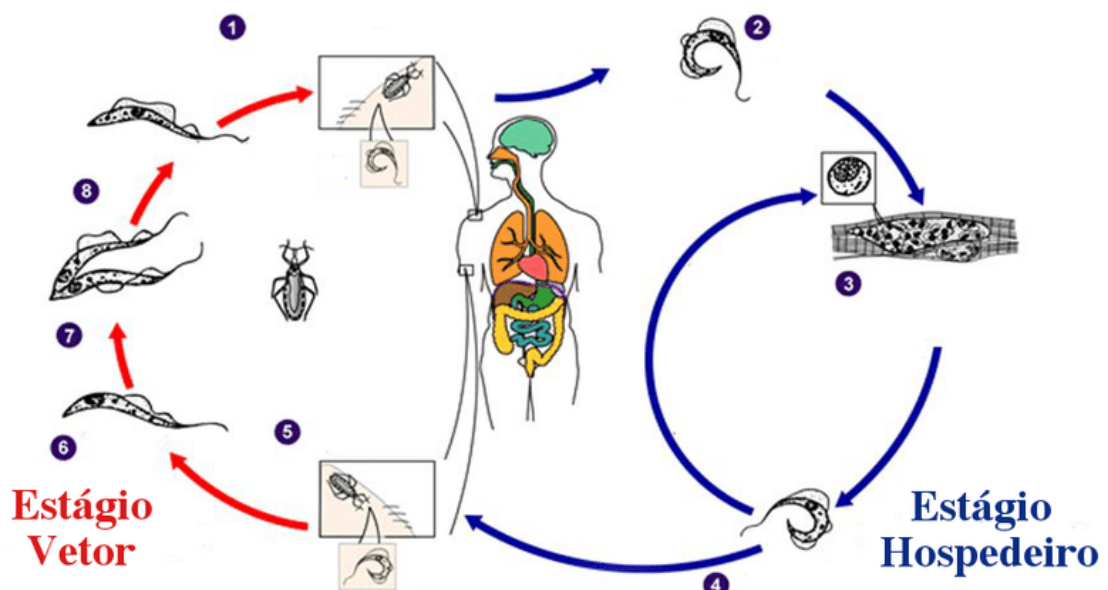
A transmissão da doença em áreas endêmicas pode acontecer por meio

de três principais gêneros de insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros (*Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A transmissão não vetorial é denominada como rota alternativa de infecção, possuindo um papel importante tanto nos países não endêmicos como também em áreas endêmicas. A parasitemia materna é um determinante biológico de transmissão congênita, podendo chegar a 31 %, sendo detectável por PCR, porém esse valor pode ser ainda maior, uma vez que há a possibilidade de falso negativo (PÉREZ-MOLINA; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2012). Entre 2 a 8 % das gestantes com DC podem passá-la para seus bebês e aproximadamente 8 mil recém-nascidos são infectados durante a gravidez a cada ano (OPAS, 2021).

De acordo com o boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde, no Brasil a forma de transmissão mais frequente registrada em 2020 foi a oral (75,34 %) pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente na região amazônica, enquanto a transmissão vetorial ocupou menos índices com 6,81 %. A DC é quase 100 % curável se tratada na fase aguda inicial, no entanto, apenas 1 % dos infectados são tratados a cada ano decorrente à presença clínica silenciosa ou expressão sintomática ambígua da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2021).

**Figura 12:** Ciclo biológico do protozoário transmissor da DC



**Legenda:** 1) Ao se alimentar de sangue, o inseto vetor *Triatominae* infectado, libera formas tripomastigotas em suas fezes perto do local da picada; 2) As formas tripomastigotas penetram no hospedeiro pela ferida ou pelas mucosas íntegras (por exemplo conjuntiva). No hospedeiro, as formas tripomastigotas infectantes invadem as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em formas amastigotas intracelulares; 3) As formas amastigotas se multiplicam por fissão binária; 4) A seguir, se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas, e saem da célula após lise celular e entram na corrente sanguínea, podendo infectar outras células em vários tecidos, nos quais se diferenciam em formas amastigotas intracelulares e as manifestações clínicas resultam desse ciclo infectivo. A multiplicação é retomada quando os parasitos entram em outra célula ou são ingeridos por outro vetor; 5) O inseto vetor é infectado ao se alimentar de sangue dos hospedeiros contendo parasitos na circulação; 6) As formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do vetor; 7) Os parasitos se multiplicam no intestino médio; 8) No intestino distal, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas infecciosas que são eliminadas junto com as fezes do vetor.

**Fonte:** Adaptado de (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS; 2010).

#### 1.6.2.2 Tratamento convencional

O tratamento da DC baseia-se em dois principais compostos nitro-heterocíclicos; o benznidazol (BZ; N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) e o nifurtimox (NFX; 3-metil-4- [5'-nitrofurfurilideneamina] tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Figura 13). São medicamentos desenvolvidos há mais de quatro décadas e apresentam alta eficácia na fase aguda, congênita e crônica (pediátrica) precoce. Porém, os perfis de segurança desses fármacos estão longe de ser ideais (ZINGALES, 2018).

O NFX foi o primeiro medicamento a ser utilizado no tratamento da DC, possui administração via oral, e o tratamento deve prosseguir entre 60 e 90 dias com 3 a 4 doses diárias, atua aumentando a produção de radicais superóxido promovendo alterações no metabolismo do parasito, no entanto, algumas cepas são resistentes a ele, levando a menor eficácia do medicamento entre pacientes infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* (MENEZES et al., 2011; SALES et al., 2017). Entre os efeitos adversos causados nos pacientes por esse medicamento, está a anorexia, perda de peso, distúrbios neurológicos (incluindo irritabilidade, insônia, alteração de humor, parestesias e neuropatia periférica), náuseas, vômito, febre e em alguns casos erupção cutânea, de modo que cerca de 75 % dos casos o tratamento era interrompido. Na década de 80, devido a ocorrência dos numerosos efeitos adversos,

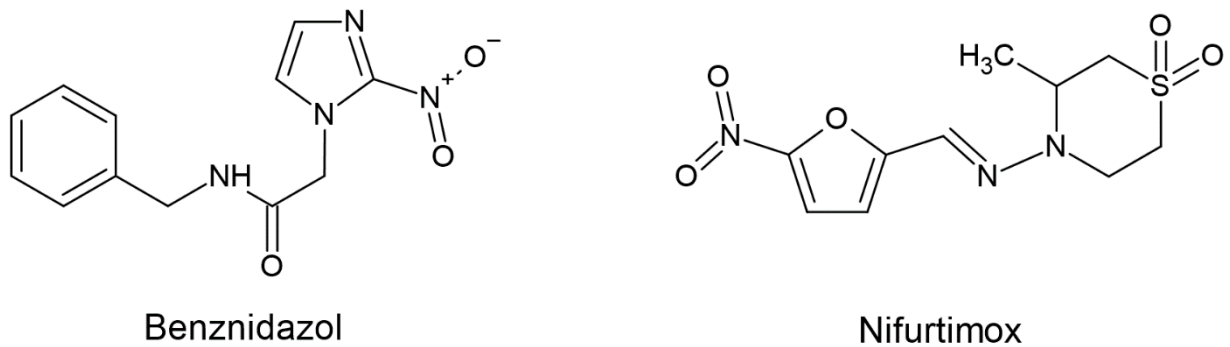
o uso do NFX foi proibido no Brasil, desde então, o BZ é o único fármaco de atividade tripanocida disponível no mercado (COURA; DE CASTRO, 2002; JACKSON et al., 2010).

As vantagens apresentadas pelo BZ em relação ao NFX estão relacionadas ao seu perfil de tolerabilidade, penetração tecidual e maior eficácia. Também possui administração oral (2 a 3 doses diárias) por um período de 60 dias. Atua por meio da formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos que são gerados quando seu grupo nitro é reduzido a um grupo amino pela ação das nitroredutases. Dessa forma, o efeito tripanocida do BZ, pode ser causado pela ligação covalente de seus metabólitos reduzidos às macromoléculas do parasito, incluindo o DNA e também pela indução de estresse oxidativo dentro do parasito, promovendo a sua morte (RAJÃO et al., 2014; SALES et al., 2017).

Os efeitos adversos relacionados ao tratamento com BZ envolvem a hipersensibilidade na forma de erupção cutânea (29 a 50 %), intolerância digestiva (5 a 15 %), anorexia, astenia, dor de cabeça e distúrbios do sono (40 %). Outro efeito acarretado pelo uso do medicamento em casos mais raros está a neuropatia e depressão da medula óssea. A descontinuidade proveniente dos efeitos adversos do tratamento ocorre em 29 % dos casos (MOLINA et al., 2015; PINAZO et al., 2010).

Neste contexto, tem sido cada vez mais estudada a utilização de compostos provenientes de fontes naturais que possam atuar como agentes terapêuticos sobre a DC, devido à alta letalidade da doença, as graves complicações e o alto custo do tratamento. Assim, se faz necessário à busca por compostos isolados de fontes naturais com atividade antiprotozoária, sendo uma alternativa promissora, com maiores efeitos sobre o parasito acompanhado por menor toxicidade às células infectadas. Além disso, compostos de origem natural podem ser uma alternativa economicamente favorável principalmente quando comparados aos fármacos de referência.

**Figura 13:** Estrutura dos fármacos de referência utilizados para o tratamento da DC



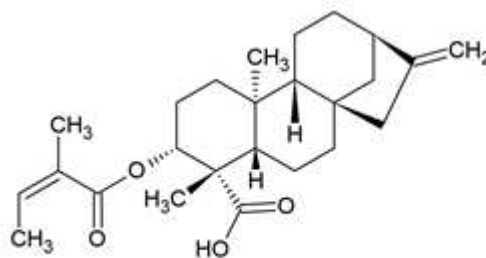
**Fonte:** Adaptado de (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS; 2010)

### 1.6.2.3 Atividade tripanocida de diterpenos cauranos

Na medicina popular, existe uma contribuição significativa dos produtos naturais no tratamento da DC (DA SILVA FERREIRA et al., 2013). Estudos relacionados a utilização de extratos ou compostos isolados obtidos a partir de fontes naturais para o tratamento de doenças parasitárias nas últimas décadas, tem sido considerado uma abordagem alternativa (TEIXEIRA et al., 2014).

Batista; Chiari; de Oliveira, (1999) isolaram do extrato etanólico de partes aéreas de *Wedelia paludosa*, os diterpenos ácido ent-caur-16-en-19-óico (Figura 5A), ácido ent-caur-9(11),16(17)-dien-19-óico (Figura 5B) e o ácido 3-angeloiloxi-ent-caur-16-en-19-óico (Figura 14). Esses compostos apresentaram atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* até mesmo na menor concentração testada de 0.68 mg/mL. Foi o primeiro relato da atividade tripanocida dos ácidos ent-caur-9(11),16(17)-dien-19-óico e 3 $\alpha$ -angeloiloxi-ent-caur-16-en-19-óico.

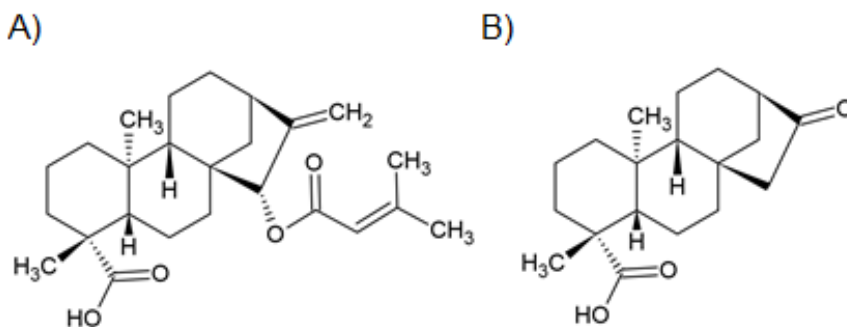
**Figura 14:** Estrutura do ácido 3-angeloiloxi-ent-caur-16-en-19-óico



**Fonte:** Adaptado de (BATISTA; CHIARI; DE OLIVEIRA, 1999)

A Asteraceae *Baccharis retusa*, é uma planta medicinal brasileira descrita na literatura para o tratamento de diversas doenças incluindo a DC. O fracionamento guiado por bioatividade do extrato de n-hexano das partes aéreas de *B. retusa* resultou no isolamento e caracterização de três diterpenos cauranos biologicamente ativos: 1) ácido ent-15 $\beta$ -senecioil-oxi-caur-16-en-19-óico (Figura 15A); 2) ácido ent-caur-16-en-19-óico (Figura 5A) e 3) ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-óico (Figura 15B). Após a identificação química desses compostos, foram avaliados a atividade tripanocida pelo ensaio colorimétrico de resazurina. De acordo com os autores, os compostos isolados apresentaram toxicidade reduzida contra linhagem celular de fibroblastos murinos (NCTC) e foram eficazes contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> de 3,8  $\mu$ M (1), 75,3  $\mu$ M (2) e 44,2  $\mu$ M (3)). Além disso, o composto 3 também apresentou atividade contra formas amastigotas de *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> de 83,2  $\mu$ M), enquanto o composto 1 apresentou o maior índice de seletividade (SI), causando permeabilização na membrana plasmática do parasito (57 %) quando comparada as formas tripomastigotas não tratadas (UENO et al., 2018)

**Figura 15:** A) Ácido ent-15 $\beta$ -senecioil-oxi-caur-16-en-19-óico e B) ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-óico



**Fonte:** Adaptado de (UENO et al., 2018)

Kian e colaboradores, (2018) mostraram a capacidade do óleo de copaíba e do KA (Figura 5A) em eliminar *T. cruzi* em macrófagos infectados principalmente pelos mecanismos do óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ERO), metabolismo do ferro e defesa antioxidante. De acordo com o estudo, ambos os compostos induziram uma resposta anti-inflamatória com aumento de IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como diminuição da produção de IL-12. Apesar de ser capaz de modular a resposta imune nas células do hospedeiro, a atividade antimicrobiana do óleo de

copaíba e do KA parece ser uma ação direta dos compostos sobre os parasitos, causando sua morte.

Apesar dos resultados promissores envolvendo os diterpenos cauranos, os estudos ainda são muito escassos quando comparados com a gama de compostos biologicamente ativos, mostrando a necessidade de aprofundamento nas pesquisas desses compostos.

Considerando o aumento da resistência desses parasitos aos agentes terapêuticos disponíveis fica evidente a necessidade de maior atenção para as doenças parasitárias, uma vez que no atual cenário farmacológico há evidente necessidade da busca de compostos mais eficazes e com menos efeitos adversos.

Dentro deste contexto, os diterpenos cauranos têm despertado grande interesse na comunidade científica, podendo representar expressivo potencial terapêutico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter análogos estruturais do KA a partir da biotransformação com *C. elegans* e avaliar a atividade leishmanicida desses compostos, além de avaliar a ação tripanocida do GFA e determinar os principais mecanismos envolvidos na morte do parasito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### CAPÍTULO II

- Isolamento e identificação do KA do extrato bruto diclorometânico das partes aéreas de *S. trilobata*;
- Submeter o KA ao processo de biotransformação microbiana a partir do fungo *C. elegans*;
- Isolamento, purificação e identificação dos principais compostos biotransformados;
- Elucidação estrutural dos análogos biotransformados;
- Estudo *in silico* dos compostos biotransformados;
- Avaliação da citotoxicidade dos compostos biotransformados em linhagem celular J774.A1;
- Avaliação do efeito leishmanicida dos compostos sobre a cinética de proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis*;

#### CAPÍTULO III

- Avaliação da atividade tripanocida direta do GFA
- Verificação das alterações ultraestruturais causadas pelo GFA sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Determinação dos principais mecanismos de morte envolvidos durante a ação direta do GFA sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*;

- Verificação da atividade anti-amastigota do GFA em J774.A1 infectados com *T. cruzi*, bem como a elucidação dos possíveis mecanismos microbicidas envolvidos;
- Investigação do efeito imunomodulador do GFA sobre J774.A1 infectados ou não com *T. cruzi*, através de dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12);
- Avaliação da produção de NO e ERO em macrófagos infectados e tratados com GFA.

## REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 5, p. 359–74, maio 1999.
- ABRÃO, F. et al. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, 21 dez. 2015.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, abr. 2011.
- ALVIANO, C. S. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17–23, 1992.
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6299–6303, 2010.
- 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.
- ARAKAWA, N. S. et al. Unusual biotransformation products of the sesquiterpene lactone budlein A by *Aspergillus* species. **Phytochemistry**, v. 96, p. 92–100, 2013.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 1 jan. 2009.
- ATAWODI, S. E. et al. In vitro trypanocidal effect of methanolic extract of some Nigerian savannah plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 9, p. 360–369, 2003.
- AVILA, C. Terpenoids in marine heterobranch molluscs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, 2020.
- BACCARIN, T. et al. Artigo Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia*. v. 19, n. November 2008, p. 612–616, 2009.
- BALAÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1 abr. 1998.
- BALEKAR, N. et al. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1178–1184, 2012a.
- BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.)

leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 817–824, 14 jun. 2012b.

BASTOS, D. Z. L. et al. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 834–839, 2007.

BATISTA, R. et al. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. January, p. 36–40, 2009.

BATISTA, R. et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 168–176, 2013.

BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta medica**, v. 65, n. 3, p. 283–284, 1999.

BERBERT, T. R. N. et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.

BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 1 abr. 2016.

BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85–89, 1998.

BLUM, M. S.; BRAND, J. A. **Social Insect Pheromones: Their Chemistry and Function**. AM. ZOOLOGIST. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article/12/3/553/1997754>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: The biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 345–347, 2004.

BOMBAÇA, A. C. S. et al. Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in trypanosomacruzi. **Molecules**, v. 23, n. 11, 28 out. 2018.

BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 408–418, 1 jan. 2019.

BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1354–1357, 2011.

BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology research**, p. 1–11, 2016.

BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes

via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11–20, 2018.

BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153536, 1 maio 2021.

BRAHMACHARI, G. Bioactive natural products: Opportunities and challenges in medicinal chemistry. **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**, p. 1–670, 1 jan. 2011.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. [s.l.: s.n.].

BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. [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.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CADENA-GONZÁLEZ, A. L.; SØRENSEN, M.; THEILADE, I. Use and valuation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquirá, Boyacá, Colombia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 23, 11 abr. 2013.

CALDWELL, G. et al. ADME Optimization and Toxicity Assessment in Early- and Late-Phase Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 965–980, 17 out. 2009.

CAMPOS, M. C. O. et al. Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: Activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1193–1204, 2010.

CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 1 jan. 2015.

CARBON-MANGELS, M.; HUTTER, M. C. Selecting relevant descriptors for classification by Bayesian estimates: A comparison with decision trees and support vector machines approaches for disparate data sets. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 10, p. 885–895, 1 out. 2011.

CARIDHA, D. et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 106–117, 1 dez. 2019.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.

CHEN, Y. et al. Biotransformation of cyperenoic acid by *Cunninghamella elegans* AS

3.2028 and the potent anti-angiogenic activities of its metabolites. **Fitoterapia**, v. 118, p. 32–37, 1 abr. 2017.

CHENG, F. et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and noninhibitors using combined classifiers. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 5, p. 996–1011, 23 maio 2011a.

CHENG, F. et al. Insights into molecular basis of cytochrome P450 inhibitory promiscuity of compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2482–2495, 24 out. 2011b.

CHENG, F. et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 26 nov. 2012.

CHOUDHARY, M. I. et al. Microbial transformation of sesquiterpenes, (-)-Ambrox® and (+)-sclareolide. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 10, p. 2685–2694, 2004.

CONCATO, V. M. et al. 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol induces cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109133, 24 maio 2020.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on chagas disease chemotherapy** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* Fundacao Oswaldo Cruz, , 2002.

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

CZUB, J.; BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes-A molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2616–2626, 1 out. 2007.

DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanocidal activity. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 557–559, 1996.

DA COSTA, R. M. et al. In vitro cytotoxicity and structure-activity relationship approaches of ent-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. **Phytochemistry**, v. 156, p. 214–223, 1 dez. 2018.

DA SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

DA SILVA FERREIRA, D. et al. Natural products and Chagas' disease: The action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, p. 243–256, 2013.

- DAI, J. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. **EXCLI journal**, v. 12, p. 479–90, 2013.
- DE CARVALHO, G. J. A. . et al. DITERPENOS, TRITERPENOS E ESTERÓIDES DAS FLORES DE *Wedelia paludosa*. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 24–26, 2001.
- DE OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 95–98, 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. Third Edit ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- DO NASCIMENTO, J. S.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; DE OLIVEIRA SILVA, E. Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 568–577, 23 ago. 2018.
- DOLAI, S.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 197, n. 1–2, p. 1–8, out. 2014.
- DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.
- DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.
- DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleena*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 259–267, 1 abr. 2017.
- FAN, Y. J.; ZONG, W. X. The cellular decision between apoptosis and autophagy. **Chinese Journal of Cancer**, v. 32, n. 3, p. 121–129, 2013.
- FELCZAK, A. et al. Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8872–8880, 1 maio 2016.
- FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro de Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4, p. 395–439, 2009.
- FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology** **2017 15:4**, v. 15, n. 4, p. 217–231, 1 abr. 2017.
- FRAGA, B. M. et al. Microbial transformation of two 15 $\alpha$ -hydroxy-ent-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 66, n. 1, p. 227–234, 2 jan. 2010.
- FRAGA, B. M. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 $\beta$ -

acetoxo derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). **Phytochemistry**, v. 81, p. 60–70, set. 2012.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101565, 29 jan. 2020.

FREITAS, T. P. et al. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol Res**, v. 157, n. 3, p. 201–206, 2002.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: **International Association for Plant Taxonomy**. [s.l.] International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 167–170, 2002.

GARCÍA, P. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 455–483, 13 mar. 2007.

GERVAZONI, L. F. O. et al. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 0, p. 1031, 23 nov. 2020.

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.

GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, n. May, p. 224–232, 2018.

GONZÁLEZ, M. A. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. **Natural product reports**, v. 32, n. 5, p. 684–704, 1 maio 2015.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma Cruzi*. In: **American Trypanosomiasis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. p. 321–338.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 1 ago. 2002.

HANSEN, K. et al. Benchmark data set for in silico prediction of Ames mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 9, p. 2077–2081, 28 set. 2009.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 1, p. 88–94, fev. 2001.

HANSON, J. R. Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1654–1663, 1 dez. 2015.

- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2831–2846, nov. 2007.
- HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kaurane and kaurene diterpenes from the stem bark of *Xylopi* acutiflora. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2134–2135, jan. 1982.
- HISSA, B. et al. Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates *Trypanosoma cruzi* Invasion of Host Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1583, mar. 2012.
- HOPKINS, A. L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682–690, 20 out. 2008.
- HUTCHISON, M.; LEWER, P.; MACMILLAN, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of eighteen derivatives of ent-kaur-16-en-19-oic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2363–2366, 1984.
- JACKSON, Y. et al. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. e69–e75, 15 nov. 2010.
- JAÉN-GIL, A. et al. Fungal treatment of metoprolol and its recalcitrant metabolite metoprolol acid in hospital wastewater: Biotransformation, sorption and ecotoxicological impact. **Water Research**, v. 152, p. 171–180, 2019.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 502, 6 dez. 2018.
- JIN, Y. et al. Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in hepg2 cells by increasing perilipin 2 expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.
- KATOCH, M.; SALGOTRA, A.; SINGH, G. Endophytic fungi found in association with *Bacopa monnieri* as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 714–722, 2014.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.
- 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.
- KEUM, Y. S.; LEE, Y. H.; JEONG-HAN, K. Metabolism of methoxychlor by *Cunninghamella elegans* ATCC36112. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7931–7937, 9 set. 2009.
- KIAN, D. et al. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.

103, n. November 2017, p. 1294–1301, 2018.

KUNDU, S.; DEY, A.; BANDYOPADHYAY, A. Stimulation of in vitro morphogenesis, antioxidant activity and over expression of kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bertoni by chlorocholine chloride. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 10, p. 2683–2693, 1 set. 2014.

LAGUNIN, A. et al. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 806–810, 1 ago. 2009.

LAKE, B. G.; PRICE, R. J. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. **Xenobiotica**, v. 43, n. 1, p. 41–53, jan. 2013.

LAMBERT, J. B.; VAGENAS, A. R. Dependence of the  $\gamma$  carbon-13 shielding effect on the dihedral angle. **Organic Magnetic Resonance**, v. 17, n. 4, p. 265–269, 1 dez. 1981.

LANG, K. et al. Biomonitored UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>2</sup> and HPLC-UV thermostability study of the aerial parts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, v. 167, n. February, p. 302–309, 2017.

LECH, J. J.; BEND, J. R. Relationship between biotransformation and the toxicity and fate of xenobiotic chemicals in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. VOL.34, p. 115–131, fev. 1980.

LEE, S.-J. et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Formation of Lipid Droplets as a Generalized Response to Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

LI, X. et al. Structures and Biological Properties of the Chemical Constituents from the Genus *Wedelia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 5, p. 823–836, 1 maio 2007.

LIMA, E. C. et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 457–65, fev. 1997.

LIMA, M. A. S. et al. *Aspergillus Niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2029–2059, 2019.

LIN, L. G. et al. Naturally occurring diterpenoid dimers: Source, biosynthesis, chemistry and bioactivities. **Planta Medica**, v. 82, n. 15, p. 1309–1328, 1 ago. 2016.

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.

LIRA, R. et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: Potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 537–546, 1 maio 2001.

LOWE, H. et al. molecules Antiviral Activity of Jamaican Medicinal Plants and Isolated Bioactiv Compounds. 2021.

MA, B. et al. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 7, p. 1067–1074, 2007.

MA, B. J. et al. ent-Kaurane diterpenoids from the plant *Wedelia trilobata*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 3, p. 107–111, 1 jun. 2013.

MACHADO, P. DE A. et al. VOSalophen: a vanadium complex with a stilbene derivative—induction of apoptosis, autophagy, and efficiency in experimental cutaneous leishmaniasis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 929–939, 2017.

MACIEL et al. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, 2006.

MACRI, J. A. et al. Immunomodulatory and Antioxidant properties of Kaurenoic acid on macrophages of BALB/c in Vitro. **American Journal of Immunology**, v. 10, n. 4, p. 183–188, 2014.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 122, p. 430–433, 2009a.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 430–433, 21 abr. 2009b.

MANDEL, J. R. et al. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 28, p. 14083–14088, 2019.

MARCHESE ROBINSON, R. L.; GLEN, R. C.; MITCHELL, J. B. O. Development and comparison of hERG blocker classifiers: Assessment on different datasets yields markedly different results. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 5, p. 443–458, 16 maio 2011.

MARCONDES-ALVES, L. et al. Kaurenoic acid extracted from *Sphagneticola trilobata* reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in mice. **Natural Product Research**, v. 6419, n. December, p. 1–4, 2017.

MARINI, V. et al. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 32–37, 2011.

MARQUINA, S. et al. Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-

beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17–18, p. 2017–2022, 1 dez. 2009.

MARTINS, C. H. G. et al. Kaurenoic acid and its sodium salt derivative: Antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and their mechanism of action. **Future Microbiology**, v. 13, n. 14, p. 1585–1601, 1 nov. 2018.

MENEZES, C. et al. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 471–479, set. 2011.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, fev. 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 1 fev. 2019.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed research international**, v. 2014, p. 614014, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. **Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis**, 16 dez. 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 286, 8 ago. 2012.

MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 392918, 2015.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO – Cyclic GMP – Protein Kinase G – ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of Natural Products**, n. 75, p. 896–904, 2012.

MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 1 out. 2015.

MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55–66, 2010.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

NAKAMURA, C. V. et al. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-based Complementary and Alternative**

**Medicine**, v. 2012, 2012.

NASCIMENTO, J. S. DO et al. Mapping the Biotransformation of Coumarins through Filamentous Fungi. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 19, 29 set. 2019.

NATH, A. et al. Quantifying and predicting the promiscuity and isoform specificity of small-molecule cytochrome P450 inhibitors. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 12, p. 2195–2203, dez. 2010.

NDOM, J. C. et al. New alkamide and ent-kaurane diterpenoid derivatives from *Senecio erectitoides* (Asteraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 4, p. 201–206, 17 dez. 2010.

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, dez. .

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, 1 dez. 2017.

NOGUEIRA, M. S. et al. ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. **Molecules**, v. 21, n. 9, set. 2016a.

NOGUEIRA, M. S. et al. ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1–14, set. 2016b.

NURBY;, R. et al. In vivo anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*. **Revista Facultad de Farmacia**, 2017.

OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial Effects of a Lipophilic Fraction and Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark Extracts of *Annona senegalensis*. v. 2012, 2012.

OKOYE, T. C. et al. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38–43, 2013.

OLIVEIRA, L. C. et al. Schistosomicidal activity of kaurane, labdane and clerodane-type diterpenes obtained by fungal transformation. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 34–40, 1 nov. 2020.

OPAS. **OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ORTIZ, J. V. et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with

post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, n. 3, p. 240–246, 1 mar. 2019.

PAGLIARA, V. et al. Bioactive ent-kaurane diterpenes oridonin and irudonin prevent cancer cells migration by interacting with the actin cytoskeleton controller ezrin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–19, out. 2020.

PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2018.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 1 dez. 2002.

PANDA, S. K.; LUYTEN, W. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. **Parasite**, v. 25, p. 10, 2018.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. . nov. 2012, p. 1959–1972.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1731–1740, dez. 2012.

PASSERO, L. F. D. et al. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1275–1286, 2 out. 2018.

PEARCE, C. M.; LUSHNIKOVA, M. V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3–4, p. 87–91, 4 ago. 2006.

PECHWANG, J. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Psilocybe cubensis*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 10, p. 905–914, jun. 2010.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: Epidemiology, clinical presentation and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, jun. 2012.

PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review). **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 49, n. 5, p. 435–49, 2013.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1–5, jan. 2012.

PFEIFER BARBOSA, A. L. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, abr. 2019.

PHAM THE, H. et al. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 4, p. 376–385, 18 abr. 2011.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, nov. 2010.

PISKA, K. et al. Cunninghamella Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 107–117, 21 jan. 2016.

POTHULURI, J. V et al. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3654–9, 1 nov. 1992.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. AUG, 6 ago. 2015.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2014.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 1 mar. 2013.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

RIBEIRO NETO, J. A. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112547, jan. 2020.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7–17, 2020.

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

ROGGERO, E. et al. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 123–131, jun. 2004.

- ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. 2008.
- RUAN, Y. et al. Specific 12 $\alpha$ -hydroxylation of grandiflorenic acid by permeabilised fungus *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 9, p. 677–679, 3 maio 2014.
- SALES, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.
- SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625–634, 1985.
- SANTOS, R. I. DOS. Metabolitos básicos e origem dos metabolitos secundários. In: UFSC (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>o</sup> ed. ed. Florianópolis: [s.n.]. p. 403–434.
- SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmele brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567–569, 1 ago. 2003.
- SAÚDE, M. DA. **Boletim epidemiológico - Doença de Chagas**. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em: 30 jul. 2021.
- SCHWIRKOWSKI, P. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: Sphagneticola trilobata**. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=7280](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7280)>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- SESSA, D. P. et al. 15 $\beta$ -Senecioid-ent-kaur-16-en-19-oic Acid, a Diterpene Isolated from *Baccharis lateralis*, as Promising Oral Compound for the Treatment of Schistosomiasis. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 12, p. 3744–3750, dez. 2020.
- SHEN, J. et al. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 6, p. 1034–1041, 28 jun. 2010.
- SIBBR. **Sphagneticola trilobata (L) Pruski**. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/285825#classification>>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- SILVA, E. A. et al. The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 397–400, 1 out. 1999.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *brasiliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–31, ago. 2009.
- SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 17 nov. 2010.

SMITHA, M. S.; SINGH, S. .; SINGH, R. Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 4, n. 2, 2017.

SOUSA, I. et al. Biotransformation of diterpenes from *Copaifera* sp. oleoresins using filamentous fungi. **Planta Medica**, v. 4, n. S 01, p. Tu-SL-03, 24 out. 2017.

SOUSA, R. DOS S. et al. POTENCIAL DA ESPÉCIE *Sphagnetocola trilobata* (L.) Pruski PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, p. 720–730, 2018.

SOUZA;, W. DE; CARVALHO;, T. M. U. DE; BARRIAS;, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

STROPPA, P. H. F.; ANTINARELLI, L. M. R.; CARLO, A. M. L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. . Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3034–3045, 2017.

SULTAN, S. et al. Fungal transformation of cedryl acetate and  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay, quantum mechanical calculations and molecular docking studies of its metabolites. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 764–770, 1 abr. 2013.

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

TAKAHASHI, J. A. et al. molecules The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. **Molecules**, v. 19, p. 1856–1886, 2014.

TAVEEPANICH, S. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Absidia blakesleeana* and *Rhizopus oligosporus*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 11, p. 1050–1058, 2010.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 10 out. 2013.

TEIXEIRA, T. L. et al. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. **Pathogens and Global Health**, v. 108, p. 30–36, 2014.

TIRINATO, L. et al. ROS and Lipid Droplet accumulation induced by high glucose exposure in healthy colon and Colorectal Cancer Stem Cells. **Genes and Diseases**, 25 set. 2019.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion:

Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf ex. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, n. September 2017, p. 662–672, 2018a.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 31 out. 2018b.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 6 jan. 2012.

UENO, A. K. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, n. October 2017, p. 55–58, 2018.

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.

VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). **Chemical reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579–612, 10 set. 2014.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VENISETTY, R.; CIDDI, V. Application of Microbial Biotransformation for the New Drug Discovery Using Natural Drugs as Substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153–167, 25 mar. 2005.

VILLA-RUANO, N.; LOZOYA-GLORIA, E.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y. Kaurenoic Acid: A Diterpene With a Wide Range of Biological Activities. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 51p. 151–174.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161–1174, 2019.

WANG, J. et al. Development of reliable aqueous solubility models and their application in druglike analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1395–1404, jul. 2007.

WANG, R.-F. et al. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 55–61, 1 jul. 2000.

WATANABE, S.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; FU, S. Structural Elucidation of Metabolites of Synthetic Cannabinoid UR-144 by *Cunninghamella elegans* Using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **AAPS Journal**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 1 mar. 2018.

WEITZMAN, I.; CRIST, M. Y. Studies with Clinical Isolates of *Cunninghamella* II. Physiological and Morphological Studies. **Mycologia**, v. 72, n. 4, p. 661–669, jul.

1980.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty** 2018 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–9, 18 jun. 2018.

WHO. **Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

WHO. **Neglected tropical diseases: enhancing safe treatment for more than 1 billion people annually**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/16-08-2021-neglected-tropical-diseases-enhancing-safe-treatment-for-more-than-1-billion-people-annually>>. Acesso em: 25 ago. 2021a.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 30 jul. 2021b.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 27 jul. 2021c.

WHO | Prevention of Chagas disease. **WHO**, 2016.

WILLIAMS, A. J. et al. Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Chemosphere**, v. 67, n. 2, p. 240–243, 1 fev. 2007.

WILLIAMS, T. et al. Induction of Effective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 88, n. 4, 23 mar. 2020.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 1 set. 2003.

XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and biotransformation of pentachlorophenol by wood-decaying white rot fungus *Phlebia acanthocystis* TMIC34875. **Journal of Wood Science**, v. 66, n. 1, 2020.

XIN, X. L. et al. Microbial transformation of acetyl-11-keto-boswellic acid by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 11, p. 1173–1178, 1 nov. 2013.

XING, H. et al. Anti-Inflammatory ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon serra*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 10, p. 2844–2853, out. 2020.

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

ZANK, S. et al. Local health practices and the knowledge of medicinal plants in a Brazilian semi-arid region: Environmental benefits to human health. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 11, n. 1, p. 11, 23 fev. 2015.

ZAWADZKA, K. et al. Carbazole hydroxylation by the filamentous fungi of the

Cunninghamella species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19658–19666, 1 dez. 2015.

ZHANG, Z. H.; HU, B. Q.; HU, G. Assessment of allelopathic potential of *Wedelia trilobata* on the germination, seedling growth and chlorophyll content of rape. **Advanced Materials Research**, v. 807–809, p. 719–722, 2013.

ZHU, Y. et al. Metabolic characterization of pyrozinib in humans by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1033–1034, p. 117–127, 15 out. 2016.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.

## CAPÍTULO II

**Atividade leishmanicida de diterpenos cauranos obtidos  
por meio da biotransformação fúngica do ácido caurenóico**

## Resumo

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. O tratamento convencional apresenta eficácia limitada, alta toxicidade, além de exigir um longo tempo. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a obtenção de novos compostos que possuam alta eficiência e menor toxicidade. Dentre os compostos naturais provenientes de plantas, destaca-se o ácido caurenóico (KA), composto com potencial para o tratamento da leishmaniose, além de apresentar características estruturais favoráveis para o processo de biotransformação. Sendo assim, neste estudo foi realizada a biotransformação fúngica por *Cunninghamella elegans* do ácido caurenóico (KA) isolados das partes aéreas da planta *Sphagneticola trilobata* e os compostos biotransformados foram avaliados quanto a atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como os efeitos citotóxicos sobre macrófagos murinos J774A.1. Inicialmente dois diterpenos cauranos foram obtidos pelo processo de biotransformação fúngica, os ácidos 7-hidróxidocaurenóico (7OHKA) e 7,9-diidroxidocaurenóico (7,9OHKA). Em seguida, foi realizado o ensaio de cinética de proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis* no período de 24, 48, 72 e 96 h após o tratamento. Os compostos foram capazes de reduzir a proliferação das formas promastigotas em todos os tempos de tratamento e em todas as concentrações testadas (10 a 110  $\mu\text{M}$ ) apresentando um efeito tardio. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  de 7OHKA e 7,9OHKA foram calculados em 72 h ( $1,58 \pm 0,36 \mu\text{M}$  e  $110,2 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ) e 96 h ( $5,62 \pm 0,18 \mu\text{M}$  e  $0,58 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ). Além disso, quando testados sobre macrófagos, ambos compostos apresentaram citotoxicidade seletiva, reduzindo de forma tardia a viabilidade destas células somente nas maiores concentrações testadas (150 e 200  $\mu\text{M}$ ), e  $\text{CC}_{50}$  nos períodos de 72 h (7OHKA  $232,5 \pm 0,02 \mu\text{M}$  e 7,9OHKA  $618,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) e 96 h (7OHKA  $279,6 \pm 0,07 \mu\text{M}$  e 7,9OHKA  $380 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ). Desta forma, pode-se inferir que o processo de biotransformação utilizando *C. elegans* para KA foi promissor na obtenção de compostos estruturalmente e biologicamente mais ativos que o material de partida. Assim, 7OHKA e 7,9OHKA apresentaram atividade leishmanicida, além de baixa citotoxicidade, podendo ser consideradas moléculas potenciais no estudo de medicamentos antiparasitários.

**Palavras-chave:** Compostos naturais, Transformação fúngica, Leishmaniose.

## Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*. Conventional treatment has limited efficacy, high toxicity, in addition to requiring a long time. Thus, it is necessary to develop new therapeutic strategies to obtain new compounds that have high efficiency and lower toxicity. Among the natural compounds from plants, kaurenoic acid (KA) stands out, a compound with potential for the treatment of leishmaniasis, in addition to presenting favorable structural characteristics for the biotransformation process. Thus, in this study, fungal biotransformation by *Cunninghamella elegans* of kaurenoic acid (KA) isolated from aerial parts of the plant *Sphagneticola trilobata* was performed and the biotransformed compounds were evaluated for leishmanicidal activity on promastigote forms of *L. amazonensis*, as well as cytotoxic effects on murine macrophages J774A.1. Initially, two kauran diterpenes were obtained by the fungal biotransformation process, the 7-hydroxykaurenoic acid (7OHKA) and 7,9-dihydroxydokaurenoic acid (7,9OHKA). Then, the assay of proliferation kinetics of promastigote forms of *L. amazonensis* was carried out in the period of 24, 48, 72 and 96 h after treatment. The compounds were able to reduce the proliferation of promastigote forms at all times of treatment and at all concentrations tested (10 to 110  $\mu\text{M}$ ) with a delayed effect. The  $\text{IC}_{50}$  values of 7OHKA and 7.9OHKA were calculated at 72 h ( $1.58 \pm 0.36 \mu\text{M}$  and  $110.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ) and 96 h ( $5.62 \pm 0.18 \mu\text{M}$  and  $0.58 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ). Furthermore, when tested on macrophages, both compounds showed selective cytotoxicity, later reducing the viability of these cells only at the highest concentrations tested (150 and 200  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{CC}_{50}$  in 72 h periods (7OHKA  $232.5 \pm 0.02 \mu\text{M}$  and 7.9OHKA  $618.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) and 96 h (7OHKA  $279.6 \pm 0.07 \mu\text{M}$  and 7.9OHKA  $380 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ). Thus, it can be inferred that the biotransformation process using *C. elegans* for KA was promising in obtaining structurally and biologically more active compounds than the starting material. Thus, 7OHKA and 7.9OHKA showed leishmanicidal activity, in addition to low cytotoxicity, and can be considered potential molecules in the study of antiparasitic drugs.

**Keywords:** Natural compound, Fungal transformation, Leishmaniasis, Kaurenoic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

Nativa de regiões tropicais, *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (Asteraceae) é uma planta herbácea popularmente conhecida como pseudo-arnica, margaridão ou pingo de ouro. Na etnofarmacologia seu uso está amplamente relacionado ao poder medicinal para o tratamento de diversas patologias relacionadas a processos inflamatórios em geral, principalmente no tratamento de feridas persistentes, úlceras e edema (MALDINI et al., 2009a). Além de compostos como esteroides e flavonoides, diterpenos do tipo caurano são majoritariamente encontrados em diferentes partes de *S. trilobata*, como ácido caurenóico (ácido ent-caur-16-en-19-oico, KA) e ácido grandiflorênico (ácido ent-caur-9(11),16-dien-19-oico, GFA) (BATISTA et al., 2009; BLOCK et al., 1998; BORTOLETI et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2001; MARCONDES-ALVES et al., 2017).

De acordo com a literatura, KA possui importantes atividades biológicas, como ação anti-inflamatória (PAIVA et al., 2002); analgésica (MIZOKAMI et al., 2012), antimicrobiana (ABRÃO; et al., 2015), e antiparasitária (KIAN et al., 2018; MIRANDA et al., 2015). Em relação a atividade leishmanicida, foi demonstrado que concentrações de KA entre 50-90uM apresentam efeito direto sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, reduz a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados e o número intracelular de formas amastigotas, através do aumento nos níveis de NO, IL-1 $\beta$  e inflamassoma (NLRP12), culminando na ativação dos macrófagos e eliminação do parasito intracelular (MIRANDA et al., 2015). Apesar dos resultados biológicos promissores relatados e principalmente dos mecanismos desencadeados pelo KA, os resultados obtidos na eliminação dos parasitos ainda estão longe do ideal proposto pela DNDi (CARIDHA et al., 2019; DON; IOSET, 2014; FIELD et al., 2017) assim, o processo de biotransformação fúngica de KA é uma proposta de otimização, a fim de aumentar a diversidade estrutural, bem como suas potencialidades biológicas.

O processo de biotransformação por fungos filamentosos é uma estratégia promissora na obtenção de novos fármacos naturais, uma vez que os sistemas enzimáticos destes organismos podem realizar reações altamente regio- e estereosseletivas sobre carbonos desativados, ou seja, carbonos que não são eletrofílicos e nem nucleofílicos, além de ser considerada uma metodologia "verde" na produção de compostos que podem apresentar maior atividade biológica quando

comparada aos seus precursores (OLIVEIRA et al., 2020). Fungos filamentosos, como *Cunninghamella elegans*, são biocatalisadores úteis neste processo, cujo metabolismo é capaz de realizar alterações em grupos funcionais, incluindo hidroxilação de anel aromático, redução de grupamentos cetônico, oxidação e desmetilação (KEUM; LEE; JEONG-HAN, 2009; PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2012; WILLIAMS et al., 2007). Fungos do gênero *Cunninghamella* também podem naturalmente metabolizar uma grande variedade de xenobióticos por meio de reações de fase I e fase II, muitas vezes resultando em novos compostos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; PEARCE; LUSHNIKOVA, 2006). Considerada uma doença tropical negligenciada, a leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, sendo endêmica em 100 países e afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2021c). As manifestações clínicas desta doença são dependentes das características intrínsecas do hospedeiro e da espécie infectante, e as lesões resultantes podem variar entre úlceras cutâneas, mucocutâneas, até mesmo a forma visceral grave e potencialmente fatal (SILVEIRA et al., 2009).

O tratamento baseia-se no uso de fármacos de primeira escolha como antimoniais pentavalentes como antimoniato de n-metilgucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam). Em casos de resistência parasitária, efeitos adversos ou contraindicações aos antimoniais, outros fármacos podem ser utilizados como pentamidina e a anfotericina B (AmB), no entanto, esses fármacos não apresentam índice terapêutico favorável. Além disso, os fármacos disponíveis no país, requerem longo tempo de tratamento, administração parenteral, além de apresentarem várias contraindicações e ocorrência de efeitos adversos ao paciente (SINGH et al., 2016; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Sendo assim, a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como alternativa no tratamento da leishmaniose se faz necessária. Portanto, no presente estudo, realizamos a obtenção de diterpenos do tipo caurano obtidos pelo processo de biotransformação por *C. elegans* e investigamos sua atividade leishmanicida em formas promastigotas, bem como sua citotoxicidade em macrófagos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO

A espécie *S. trilobata* foi coletada no horto de plantas medicinais do Centro de Ciências Agrárias (CCA) (23°32'64" N/51°20'63" W), localizada no campus da Universidade Estadual de Londrina (Londrina – PR). O material testemunho foi identificado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Odete Santos Vieira e depositado no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL 49306).

As folhas foram previamente separadas e secas em estufa de ar circulante, submetidas em seguida ao processo de maceração com diclorometano por 48 h em frascos âmbar. Após esse período, foi realizado a filtração e a extração repetida até o total esgotamento do material vegetal, posteriormente foi submetida à secagem do solvente através de rotaevaporador a 45 °C (RE-301-BM-500 Yamato<sup>®</sup>).

### 2.2 PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO

Inicialmente, o extrato bruto foi submetido ao fracionamento por meio de cromatografia líquida a vácuo (CLV). Para realização da CLV, utilizou-se uma coluna de vidro com placa porosa sinterizada e como fase estacionária uma mistura de sílica gel 60 H (Merck, cod. 7736) e sílica gel 60 (Merck, 230 – 400 mesh, cod 9385). A coluna cromatográfica foi previamente preenchida com a fase estacionária e saturada com a fase móvel inicial (Hexano 100 %). Posteriormente amostra foi solubilizada em uma quantidade mínima de diclorometano e incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 H, em seguida, foi inserida dentro da coluna para a realização do fracionamento em gradiente crescente de polaridade (Hexano: Acetato de Etila: Metanol). Cada fase móvel utilizada foi submetida a secagem por rotaevaporação. As frações obtidas foram analisadas através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e a que apresentou melhor perfil cromatográfico, foi submetida a outro processo de CLV.

O mesmo procedimento foi realizado para a segunda CLV, no entanto foram utilizados como fase estacionária sílica gel (Acros Organics – [0,035-0,070] mm 60A). fração escolhida, foi fracionada através da CLV (Tabela 1), em gradiente

crecente de polaridade. As frações obtidas foram concentradas por rotaevaporação e monitorados por CCDC em diferentes polaridades de fase móvel.

**Tabela 1:** Esquema do fracionamento para a 2ª CLV da fração 9:1 em gradiente crescente de polaridade e volume de solvente utilizado

Frações	Solventes e Proporção (%)	Volume (mL)
1	Hexano 100	1000
2	Hexano:Acetato de etila 98:2	1000
3	Hexano:Acetato de etila 96:4	1000
4	Hexano:Acetato de etila 94:6	1000
5	Hexano:Acetato de etila 92:8	1000
6	Hexano:Acetato de etila 90:10	1000
7	Hexano:Acetato de etila 80:20	1000
8	Hexano:Acetato de etila 70:30	1000
9	Hexano:Acetato de etila 50:50	500
10	Acetato de etila 100	500
11	Metanol 100	1000

A fração a ser trabalhada foi escolhida a partir da análise da CCDC e da formação de precipitados e cristais, a respectiva fração (F6) foi submetida ao processo de lavagem por solvente com metanol em baixa temperatura, mantendo por 24 horas sob refrigeração (-20 °C), este procedimento foi realizado até a lavagem de todos os cristais formados. Dentre as frações resultantes da segunda CLV, a observação da CCDC, indicou que a fração nº 7 (80:20) possibilitou à realização de uma terceira CLV nas mesmas condições de preparo anteriormente especificadas, e o seu esquema de fracionamento foi descrito na Tabela 2.

**Tabela 2:** Esquema do fracionamento para a 3° CLV da fração 7 (80:20) em gradiente crescente de polaridade e volume de solvente utilizado

Frações	Solventes e Proporção (%)	Volume (mL)
F1	Hexano 100	1000
F2	Hexano:Acetato de etila 94:6	1000
F3	Hexano:Acetato de etila 90:1	1000
F4	Acetato de etila 100	1000
F5	Metanol 100	1000

Foi observado nas frações da 3° CLV (Tabela 2), se houve a presença de formação de precipitado, além da formação de cristais, sendo esses os parâmetros que levou a escolha da fração a ser trabalhada. Deste modo a fração (F3) foi submetida ao processo de lavagem por solvente com metanol gelado, mantendo por 24 h sob refrigeração (-20 °C), este procedimento foi realizado até que o metanol e os cristais se tornassem totalmente límpidos.

### 2.3 PROCESSO DE RECRISTALIZAÇÃO

O precipitado foi solubilizado em banho-maria com acetona PA e, posteriormente foi adicionado hexano até observar a turvação. O frasco foi fechado e mantido sob refrigeração (-20 °C) por dois dias para a recristalização. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e o frasco com os cristais colocado em dessecador. Obteve-se cristais brancos que foram monitorados por análise em CCDC e revelada em anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 120 °C.

### 2.4 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO MAJORITÁRIO

Após o processo de recristalização, os cristais foram submetidos a análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no espectrômetro Bruker Avance Modelo III, utilizando experimentos de 1D 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

comparados com base nos dados da literatura. Após a caracterização, o KA foi submetido ao processo de biotransformação.

## 2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO FÚNGICA

### 2.5.1 Micro-Organismo e Manutenção

A cepa de *C. elegans* (ATCC 10028b) utilizadas nos processos de biotransformação foram gentilmente fornecidas a partir da coleção de cepas Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca de São Paulo, Brasil.

A manutenção do fungo assim como a preparação e extração dos fluídos das culturas foram realizados de acordo com Freitas e colaboradores (2002) com modificações. A cepa foi armazenada em estufa microprocessada para cultura bacteriológica (Sterilifer, São Paulo, BR), sob a temperatura de 28 °C. O cultivo para o preparo do inóculo foi realizado a partir da cepa de manutenção em tubos de ensaio contendo meio batata dextrose ágar (BDA) (Neogen CM) inclinado, seguidos por incubação em estufa bacteriológica nas mesmas condições durante 72 h, para induzir a formação de conídios e esporangiosporos.

### 2.5.2 Inóculo

Após 72 h de cultivo da cepa em tubos de ensaio com meio BDA inclinado, foi realizado o preparo do inóculo a partir da transferência de uma pequena quantidade de esporos e conídios presentes no tubo de ensaio para o centro das placas de Petri previamente preparadas em meio estéril contendo 25 mL de meio BDA e mantidas a 4 °C. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 °C, por 5 dias para o desenvolvimento dos esporos.

### 2.5.3 Biotransformação em Escala Semipreparativa

Após o período de produção, os esporos foram ressuspensos em água destilada previamente autoclavada, seguidos por raspagem com bastão de vidro. A suspensão de esporos fúngicos foi mantida por 30 min no banho de ultrassom (Eco-sonics – Ultronique® Indaiatuba, BR), seguidos por contagem em câmara de Neubauer a fim de se obter  $3 \times 10^4$  esporos/mL para o processo de biotransformação que inicialmente foi realizado em pequena escala para validação do método experimental.

Foi realizado o processo de biotransformação microbiana em duas etapas utilizando *C. elegans* em cultura líquida submersa agitada. Um inóculo de  $3 \times 10^4$  esporos/mL foram adicionados assepticamente a 10 frascos Erlenmeyer de boca larga (250 mL) contendo 50 mL de meio Czapeck (Tabela 3) previamente estéril conforme descrito na literatura (ALVIANO et al., 1992). As culturas foram incubadas a 28 °C usando uma incubadora refrigerada shaker de piso (CT-713 - LUCADEMA) operando a 150 rpm. Após 72 h de incubação, os micélios resultantes foram colhidos utilizando processo de filtração a vácuo, lavados com água destilada esterilizada e transferidos assepticamente para 10 novos frascos Erlenmeyer de boca larga (250 mL) autoclavados contendo 50 mL de meio Czapeck com restrição de sacarose (Tabela 3) previamente estéril.

Dois frascos foram mantidos somente com o fungo e meio Czapeck com restrição de sacarose (controle), 4 frascos com 0,3 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (controle DMSO) e 4 frascos com 0,2 mg/mL de KA diluídos a 0,5 % de DMSO. A incubação foi interrompida após cinco dias sendo monitoradas diariamente por CCDC, a partir da partição do meio de cultura com 2x o volume de acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ) em relação ao meio, até total desaparecimento do KA, ou seja, até que indicasse a total bioconversão deste composto, de acordo com as condições experimentais descritas na literatura (DE OLIVEIRA; SANTOS; ESPÍNDOLA, 2002).

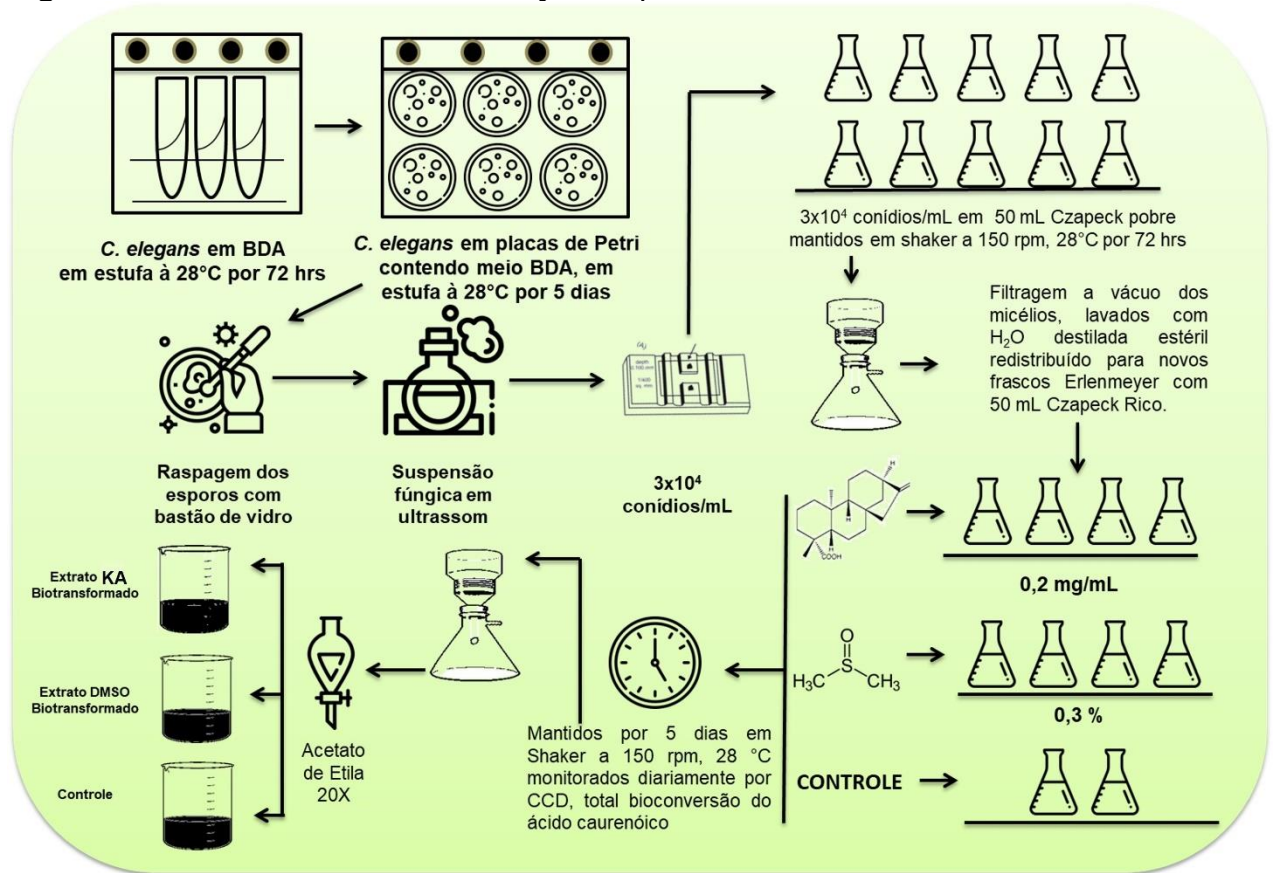
**Tabela 3:** Composição do meio Czapeck utilizado no processo de biotransformação fúngica por *C. elegans*

<b>Composição do meio</b>	<b>Czapeck</b>	<b>Czapeck com restrição de Sacarose</b>
Sacarose	3,0 %	0,3 %
NaNO <sub>3</sub>	0,2 %	0,2 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 %	0,05 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 %	0,05 %
KCl	0,05 %	0,05 %
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001 %	0,001 %
H <sub>2</sub> O	1000 mL	1000 mL

#### 2.5.4 Filtração e Extração

Após 5 dias de incubação, os conteúdos de cada um dos grupos experimentais foram reunidos (Controle, DMSO e KA Biotransformado) e a separação da biomassa foi realizada através da filtração em funil de Büchner com gaze sob vácuo. O filtrado foi particionado 20 x com porções de 1 mL de C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, obtendo-se duas frações: fração aquosa extraída (descartada) e fração acetato de etila. Adicionou-se sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Synth<sup>®</sup>) à fração acetato de etila e procedeu-se a filtração com papel filtro. O filtrado foi submetido ao rotaevaporador (RE-301-BM-500 Yamato<sup>®</sup>), resultando em um extrato bruto seco para posterior purificação. O resumo do processo de biotransformação foi representado na Figura 1.

**Figura 1:** Processo de biotransformação esquematizado



**Fonte:** Próprio autor

### 2.5.5 Procedimento de Biotransformação em Escala Preparativa

Para a realização do processo de biotransformação em escala ampliada, o mesmo procedimento experimental foi realizado com algumas modificações. Após o período de crescimento dos esporos, os mesmos, foram ressuspensos em água destilada previamente autoclavada, seguidos por raspagem com bastão de vidro. A suspensão fúngica foi mantida por 30 min no banho de ultrassom (Eco-sonics – Ultronique® Indaiatuba, BR), seguidos por contagem em câmara de Neubauer a fim de se obter  $3 \times 10^4$  esporos/mL para o processo de biotransformação, realizado em duas etapas utilizando cultura líquida submersa agitada, denominadas pré-fermentativa e fermentativa.

Para a etapa pré-fermentativa um inóculo de  $3 \times 10^4$  esporos/mL foram adicionados assepticamente a 7 frascos Erlenmeyer (2000 mL) contendo 400 mL de meio Czapeck (Tabela 3) previamente estéril conforme descrito na literatura (ALVIANO et al., 1992). As culturas foram incubadas a 28 °C usando uma incubadora

refrigerada shaker de piso (CT-713 - LUCADEMA) operando a 150 rpm. Após 72 h de incubação, a massa micelial formada foram colhidos utilizando processo de filtragem a vácuo, lavados com água destilada esterilizada e transferidos assepticamente para sete novos frascos Erlenmeyer (2000 mL) autoclavados contendo 400 mL de meio Czapeck com restrição de sacarose (Tabela 3). Dois frascos foram mantidos somente com o fungo e meio Czapeck com restrição de sacarose (controle), 2 frascos com 0,3 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (controle DMSO) e 3 frascos com 0,2 mg/mL de KA diluídos a 0,5 % de DMSO. O processo de biotransformação foi interrompido após cinco dias, sendo monitoradas diariamente por CCDC, a partir da partição do meio de cultura com 2x o volume de  $C_4H_8O_2$  em relação ao meio, até total desaparecimento do KA, ou seja, até que indicasse a total bioconversão deste composto, de acordo com as condições experimentais descritas na literatura (DE OLIVEIRA; SANTOS; ESPÍNDOLA, 2002).

#### 2.5.6 Filtração e Extração

Após 5 dias de incubação o conteúdo dos 7 Erlenmeyer foram reunidos (Divididos entre Controle, DMSO e KA Biotransformado) e a biomassa foi filtrada em funil de Büchner com gaze sob vácuo. A fração aquosa foi transferida para um funil de separação, onde foi particionado na proporção de 1:10 realizados em 5 etapas de  $C_4H_8O_2$  onde foram obtidas duas frações: fração aquosa extraída (descartada) e fração acetato de etila. Adicionou-se  $Na_2SO_4$  (Synth<sup>®</sup>) à fração acetato de etila e seguidos pelo processo de filtração com papel filtro com o auxílio de um funil. O filtrado foi evaporado em rotaevaporador (RE-301-BM-500 Yamato<sup>®</sup>), resultando em um extrato bruto seco identificado com CeE (extrato de *C. elegans*; 0,505 g) para posterior purificação.

#### 2.6 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO DITERPENO CAURANO BIOTRANSFORMADO

O extrato CeE foi submetido à cromatografia clássica. Em uma bureta de 100 mL, foram adicionados 48 g de sílica gel 60 (Merck, 230 – 400 mesh, cod 9385) como fase estacionária e como fase móvel foram utilizados um sistema de eluentes com hexano, acetato de etila e diclorometano na proporção de 7:2:1. Inicialmente a

coluna cromatográfica foi previamente preenchida com a fase estacionária, promovendo a saturação da coluna. Cada fração foi composta por 10 mL recolhidos da coluna, para isso foram utilizados frascos de vidro (aproximadamente 30 mL) previamente lavados e identificados. O processo de monitoramento das frações foi realizado por CCDC, seguidos por agrupamento das frações semelhantes.

A identificação da estrutura química das substâncias isoladas a partir do agrupamento das frações foram identificadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) obtidos em um espectrômetro Bruker Modelo Avance II, operando a 400 MHz  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , equipados com sondas multinucleares de 5 mm. Os compostos isolados foram solubilizados em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para obtenção dos espectros de RMN 1D (hidrogênio, carbono, DEPT 135 e DEPT 90) e 2D HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) a fim de verificar os  $^1\text{H}$  diretamente acoplados aos  $^{13}\text{C}$ ; HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) para verificar os  $^1\text{H}$  acoplados a outros  $^{13}\text{C}$ , COSY (do inglês *Correlation Spectroscopy*) para verificar o acoplamento entre diferentes  $^1\text{H}$  e NOESY (do inglês *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) apresenta as correlações entre hidrogênios que interagem espacialmente. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram calibrados utilizando os sinais do solvente, sendo 49,00 ppm e 4,87 ppm respectivamente e as áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades foram descritas como: *singleto (s)*, *duplete (d)*, *duplo duplete (dd)* e *multiplete (m)*. As análises descritas foram realizadas no LABSPEC – UEL (CCE – Professor responsável Dr. Fernando César de Macedo Junior). Os resultados foram analisados e comparados com base nos dados da literatura.

## 2.7 ESTUDO *IN SÍLICO* DO 7OHKA E DO 7,9OHKA.

Foi realizado o estudo *in silico* dos compostos biotransformados 7OHKA e 7,9OHKA com o objetivo de avaliar teoricamente os parâmetros de similaridade dos fármacos, como propriedades de disponibilidade oral, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). O software utilizado para o cálculo das propriedades de biodisponibilidade oral foi o Molinspiration ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)) de acordo com a “regra dos cinco” (R5) proposta por Lipinski (LIPINSKI, 2004) seguida pela regra proposta por Veber e colaboradores (VEBER et al., 2002). De acordo com R5, os parâmetros avaliados foram peso molecular ( $\leq 500$ ), lipofilicidade (Log P) ( $\leq 5$ ),

aceptores de ligação de hidrogênio ( $\leq 10$ ) e doadores de ligação de hidrogênio ( $\leq 5$ ). De acordo com Veber, foram analisados o número de ligações rotativas ( $\leq 10$ ), a área de superfície polar molecular (TPSA) ( $\leq 140 \text{ \AA}$ ) além da soma de aceptores e doadores de hidrogênio. As previsões das propriedades ADMET (do inglês *absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*) foram calculadas usando o banco de dados online admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/>) (CHENG et al., 2012). Os parâmetros previstos foram carcinogenicidade (LAGUNIN et al., 2009), mutagenicidade AMES (HANSEN et al., 2009), permeação da barreira hematoencefálica, absorção intestinal (SHEN et al., 2010), permeabilidade Caco-2 (PHAM THE et al., 2011), inibição de hERG (MARCHESE ROBINSON; GLEN; MITCHELL, 2011), solubilidade aquosa (WANG et al., 2007) e inibição das principais isoformas do citocromo P450, bem como sua promiscuidade de inibição (CHENG et al., 2011b).

## 2.8 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS

### 2.8.1 Manutenção das Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

As formas promastigotas de *L. (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 % SBF (GIBCO), HEPES 10 mM, 1 % urina humana, 1 % L-glutamina, estreptomicina com penicilina (10 U/ml-10  $\mu\text{g/ml}$ ) (GIBCO) e 10 % bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi realizado em estufa do tipo D.B.O a 25 °C, em frasco de cultura 25 cm<sup>2</sup>. Em todos os experimentos foram utilizadas as formas promastigotas no quinto dia de cultura, como descrito por (GONÇALVES et al., 2018).

### 2.8.2 Cultivo Celular

A linhagem celular J774A.1 (do inglês *mus musculus ascites reticulum cell*) (TIB-67™; ATCC®, Manassas, VA, EUA) foi cultivada em meio RPMI 1640 contendo 1 % L-glutamina, 10 % bicarbonato de sódio, 10 % SBF, estreptomicina e penicilina (GIBCO). As células foram mantidas em incubadora (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

### 2.8.3 Cinética de Proliferação do 7OHKA e do 7,9OHKA

Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $10^6$  células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos 7OHKA e do 7,9OHKA (10, 30, 50, 70, 90, 110  $\mu\text{M}$ ) essas concentrações foram pré-determinadas de acordo com dados da literatura (MIRANDA et al., 2015). As formas promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 h de tratamento. Como controle negativo foi utilizado formas promastigotas mantidas em meio de cultura 199, como veículo, formas promastigotas tratadas com DMSO (0,01 %) e como controle positivo, formas promastigotas foram tratadas com anfotericina B (AmB - 1  $\mu\text{M}$ ).

### 2.8.4 Viabilidade de Macrófagos Murinos

Para avaliar se KA, 7OHKA e 7,9OHKA afetariam a viabilidade de células da linhagem J774A.1 (macrófago murino), foi realizado o ensaio de viabilidade com base na oxidação mitocondrial por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) conforme descrito na literatura (BORTOLETI et al., 2021). As células J774A.1 ( $3 \times 10^4$  células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços com 200  $\mu\text{L}$  de meio DMEM suplementado com 10 % SBF por 24 h ( $37^\circ\text{C}$ , 5 % de  $\text{CO}_2$ ). Após esse período, as células aderentes foram incubadas com KA e com os compostos biotransformados (7OHKA e 7,9OHKA) em diferentes concentrações (10-200  $\mu\text{M}$ ) por 24 e 48 h nas mesmas condições. As células foram lavadas com PBS e adicionado MTT (0,33 mg/mL) aos poços por um período de 4 h. O produto MTT (cristais de formazan) foi diluído com 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (Sigma-Aldrich) e analisado em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA, EUA) a 550 nm. Como controle positivo foi usado  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo de controle calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = (amostras dos tratados com KA, 7OHKA ou 7,9OHKA / amostra OD não tratada)  $\times$  100. A concentração citotóxica para 50 % das células ( $\text{CC}_{50}$ ) foi calculada por regressão não linear para a curva de dose-resposta usando o software Graph Pad Prism 8.0.

### 2.8.5 Índice de Seletividade dos Compostos Biotransformados

O índice de seletividade (IS) é a relação entre a citotoxicidade do composto na linhagem celular e atividade leishmanicida. O cálculo foi realizado a partir da razão entre a concentração inibitória para metade da formas promastigotas de *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub>) e concentração citotóxica para metade das células J774A.1 (CC<sub>50</sub>) (DON; IOSET, 2014)

### 2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). 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 ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

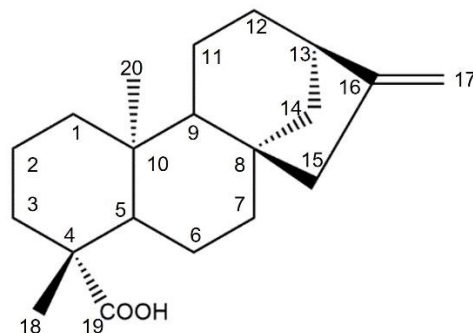
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO CAURENÓICO ISOLADO DAS PARTES AÉREAS DE *SPHAGNETICOLA TRILOBATA* POR RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ .

A *S. trilobata* foi selecionada visando o isolamento de um de seus principais constituintes: o diterpeno caurano KA. Desta forma, 16,88 g de 50,66 g do extrato bruto diclorometânico seco foram submetidos à CLV e após a realização deste processo, foi selecionada a fração 9:1 (5,855 g) para uma nova CLV por apresentar melhor perfil cromatográfico.

A partir da segunda CLV realizada com a fração 9:1, a nova fração 90:10 (F6) (0,4961 g) apresentou a formação de um precipitado, que após o procedimento de lavagens sucessivas com metanol em baixa temperatura, o sobrenadante foi separado dos precipitados e submetido às análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  seguidos de comparação com os dados da literatura (OKOYE et al., 2013; RUAN et al., 2014; SILVA et al., 1999; TAVEEPANICH et al., 2010). A Fração 3 (F3 – 90:10) (13 mg) proveniente ao último processo de CLV, após o procedimento de lavagem com metanol em baixa temperatura para a limpeza dos cristais também foi submetida às análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 3 e 4) seguidos de comparação com os dados já relatados na literatura conforme tabela abaixo (Tabela 4) (OKOYE et al., 2013; RUAN et al., 2014; SILVA et al., 1999). Ambos os compostos codificados como (WPF06 e WPF13), referiam-se ao mesmo composto. Foram obtidas na forma de um pó amorfo branco, solúvel em clorofórmio as frações foram identificadas como o KA representado abaixo na figura 2.

**Figura 2:** Estrutura do KA isolado da *S. trilobata*



**Fonte:** (MIZOKAMI et al., 2012)

**Tabela 4:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\delta$  em ppm) e  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\delta$  em ppm) do KA (1) comparado com dados da literatura em  $\text{CDCl}_3$ .

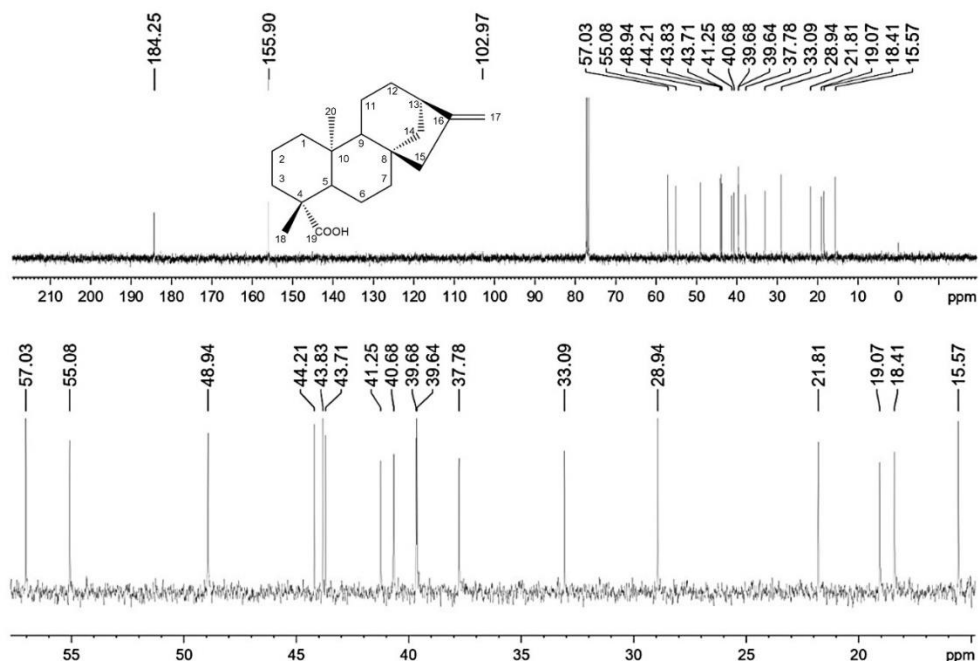
Posição	OKOYE et al. (2013)		1	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	41,48	H-1a 0,82 <i>m</i>	40,67	H-1a 0,81 <i>m</i>
		H-1b 1,54 <i>m</i>		H-1b 1,50 <i>m</i>
2	19,29	1,42 <i>m</i> (2H)	19,06	H-2a 1,42 <i>m</i>
				H-2b 1,45 <i>m</i>
3	37,97	H-3a 1,01 <i>m</i>	37,77	H-3a 1,01 <i>m</i>
		H-3b 2,17 <i>m</i>		H-3b 2,17 <i>m</i>
4	43,95	-	43,71	-
5	57,26	1,07 <i>m</i>	57,02	1,06 <i>m</i>
6	28,03	H-6a 1,62 <i>m</i>	21,80	H-6a 1,64 <i>m</i>
		H-6b 1,84 <i>m</i>		H-6b 1,83 <i>m</i>
7	40,90	H-7a 1,44 <i>m</i>	41,25	H-7a 1,47 <i>m</i>
		H-7b 1,54 <i>m</i>		H-7b 1,54 <i>m</i>
8	44,05	-	44,20	-
9	55,29	1,05 <i>m</i>	55,07	1,05 <i>s</i>
10	39,85	-	39,64	-
11	18,64	H-11a 1,60 <i>m</i>	18,40	H-11a 1,59 <i>s</i>
		H-11b 1,88 <i>m</i>		H-11b 1,87 <i>m</i>
12	33,97	H-12a 1,46 <i>m</i>	33,08	H-12a 1,46 <i>m</i>
		H-12b 1,62 <i>m</i>		H-12b 1,61 <i>m</i>
13	43,95	2,61 <i>sl</i>	43,82	2,63 <i>m</i>
14	39,90	H-14a 1,16	39,67	H-14a 1,14 <i>m</i>
		H-14b 2,02		H-14b 2,00 <i>s</i>
15	48,48	2,06 <i>sl</i>	48,93	2,05 <i>m</i>
16	156,12	-	155,89	-
17	103,21	H-17a 4,72 <i>s</i>	102,97	H-17a 4,73 <i>s</i>
		H-17b 4,78 <i>s</i>		H-17b 4,79 <i>s</i>
18	29,18	1,22 <i>s</i> (3 H)	28,94	1,24 <i>s</i> (3 H)
19	184,94	-	184,24	-
20	15,79	0,93 <i>s</i> (3 H)	15,57	0,95 <i>s</i> (3 H)

**Legenda:** ( $\delta$ ) deslocamento químico em ppm; (s) *singleto*, (sl) *singleto largo* e (m) *multiplete*;

Com base nos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (Figura 3 e 4) e no padrão espectroscópico de diterpenos isolados da *S. trilobata*, o composto 1 foi predito como um diterpeno ent-caurano. Em particular, os dados de RMN sugerem que 1 é o composto KA (MARCONDES-ALVES et al., 2017; OKOYE et al., 2013).

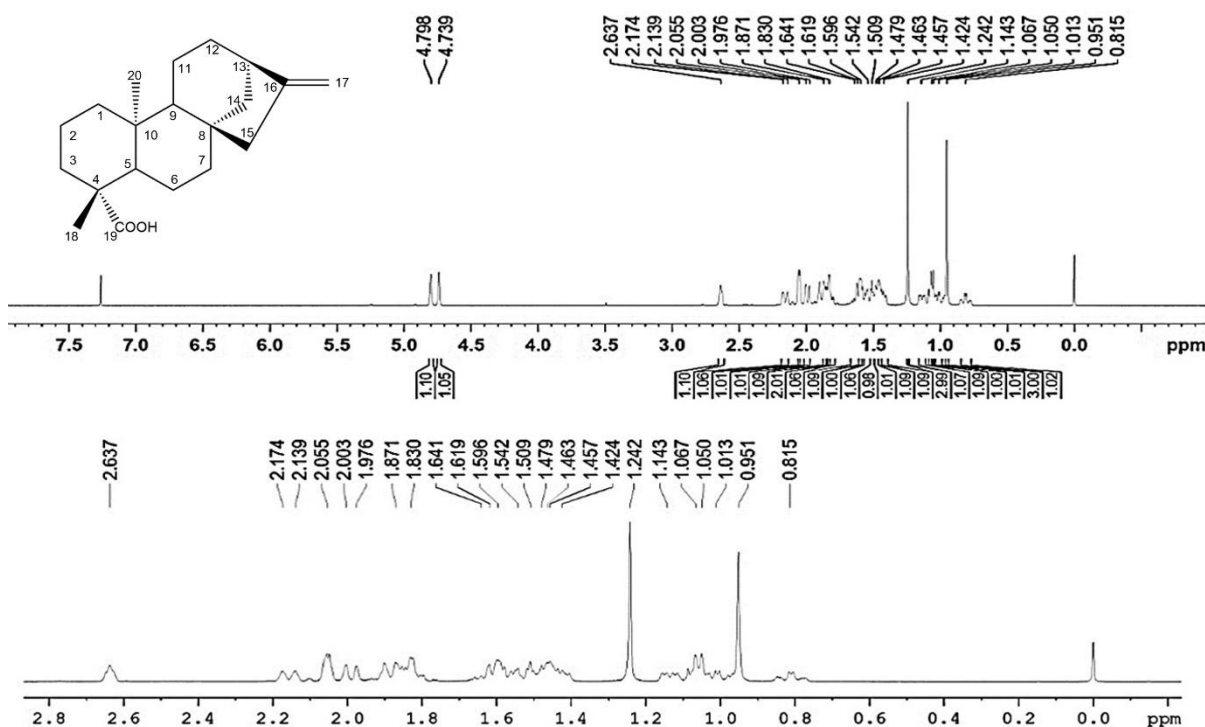
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 3), apresentou os sinais correspondentes a vinte átomos de carbonos. Destes, 5 sinais foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 3 carbonos metínicos, 10 carbonos metilênicos e 2 carbonos metílicos. Os sinais dos carbonos metínicos ( $\delta_{\text{C}}$  57,02; 55,07 e 43,82 ppm) comparados com os dados da literatura (OKOYE et al., 2013) sugerem um esqueleto carbônico para diterpenos tetracíclico do tipo caurano. Destacam-se também os sinais correspondentes ao carbono referente ao ácido carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  184,24 ppm) e a presença do carbono insaturado C16 ( $\delta_{\text{C}}$  155,89 ppm). A ocorrência do maior valor de deslocamento químico no C16, ocorre devido a desblindagem presente quando comparado ao outro carbono insaturado C17 ( $\delta_{\text{C}}$  102,97 ppm). Por ser um carbono quaternário, C16 é capaz de realizar uma hiperconjugação com os carbonos vizinhos, permitindo o compartilhamento de elétrons, resultando na diminuição de sua blindagem.

**Figura 3:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do KA (1) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 60 ppm



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  observou-se a presença de 2 singletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,95 e 1,24 ppm (Figura 4) correspondentes as 2 metilas da molécula (H-20 e H-18 respectivamente). Também foram identificados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  a presença de dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  4,73 e 4,79 ppm referente aos hidrogênios insaturados (17a e 17b). As demais multiplicidades e deslocamentos químicos estão compilados na tabela acima (Tabela 4) e demonstrados no espectro na figura 4, apresentando a amplificação da região de 0 a 2,8 ppm.

**Figura 4:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do KA (1) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 2,8 ppm



### 3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR RMN DE 1D E 2D DOS ANÁLOGOS OBTIDOS A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO KA POR *C. ELEGANS*

De acordo com a literatura, o KA pode ser considerado um promissor material de partida para o processo de biotransformação microbiana, devido sua disponibilidade em diferentes fontes naturais como nas raízes e partes aéreas das plantas *S. trilobata* (BATISTA et al., 2009; MARCONDES-ALVES et al., 2017), *Copaifera* spp (DOS SANTOS et al., 2013; KIAN et al., 2018; VARGAS et al., 2015), *Viguiera* spp (AMBROSIO et al., 2006). Outro fator importante são suas atividades

biológicas previamente relatadas, como atividade leishmanicida (MIRANDA et al., 2015), tripanocida (KIAN et al., 2018), antimicrobiana (OKOYE et al., 2012), antinociceptiva (BLOCK et al., 1998; MIZOKAMI et al., 2012), antibacteriana (MARTINS et al., 2018), antioxidante e imunomoduladora (MACRI et al., 2014).

A modificação por fungos filamentosos dessa molécula, pode gerar novos compostos ou até mesmo com atividades biológicas superiores (PECHWANG et al., 2010).

O processo de biotransformação fúngica do KA (320 mg inicial) utilizando o fungo *C. elegans*, foi monitorado diariamente por CCDC (Fase móvel 7:2:1 – Hexano/Acetato de etila/Diclorometano). Após 5 dias do início do processo fermentativo (Fase II), foi possível verificar o total desaparecimento da mancha referente ao KA pela CCDC, indicando total biotransformação do composto inicial. Devido a essa análise inicial, o processo fermentativo foi encerrado seguido por filtração e separação do meio fermentativo da massa micelial, onde o caldo fermentativo foi submetido a partição com acetato de etila (repetida por 20 x com 1000 mL do solvente) até total esgotamento do material. Foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a fase orgânica para a remoção da água restante, seguidos por filtragem com o auxílio de papel filtro.

Com o auxílio de um rotaevaporador, todo solvente presente no extrato do KA biotransformado foi seco (275 mg), e após esse procedimento esse material foi submetido à cromatografia clássica (CC - 48 g sílica) utilizando como fase móvel 600 mL dos solventes na seguinte proporção: 7:2:1 (Hexano: Acetato de etila: Diclorometano – com 1 % de ácido acético).

Os frascos provenientes da CC (130 frascos) foram monitorados por CCDC (utilizando fase móvel 7:3 – Hexano: acetato de etila – com 1 % de ácido acético), seguidos pela junção dos frascos que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, conforme apresentados abaixo na Tabela 5.

**Tabela 5:** Junção dos frascos obtidos da CC do extrato biotransformado de KA.

<b>Frascos Unidos</b>	<b>Nova Identificação</b>	<b>Rendimento (g)</b>
1-6	A	0,003
7-12	B	0,019
13-17	C	-
18-22	D	0,001
23	E	-
24-26	F	0,007
27-30	G	0,008
<b>31-38</b>	<b>H</b>	<b>0,036</b>
39-53	I	0,010
<b>54-70</b>	<b>J</b>	<b>0,030</b>
71-79	K	0,010
80-92	L	0,012
93-113	M	0,002
114-130	N	0,019

De acordo com a tabela acima as frações H e J apresentaram melhor rendimento após a evaporação do solvente (13,09 e 10,9 % respectivamente) quando comparado com a quantidade inicial do KA. As amostras apresentaram a formação de um sólido amorfo, de coloração branca. Em seguida, os metabólitos foram submetidos a análise de 1D-RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  [DEPT 90 e DEPT 135]) e 2D (COSY, HMBC, HSQC, NOESY) e foram comparados com os dados da literatura (OLIVEIRA et al., 2020; SILVA et al., 1999; TAVEEPANICH et al., 2010).

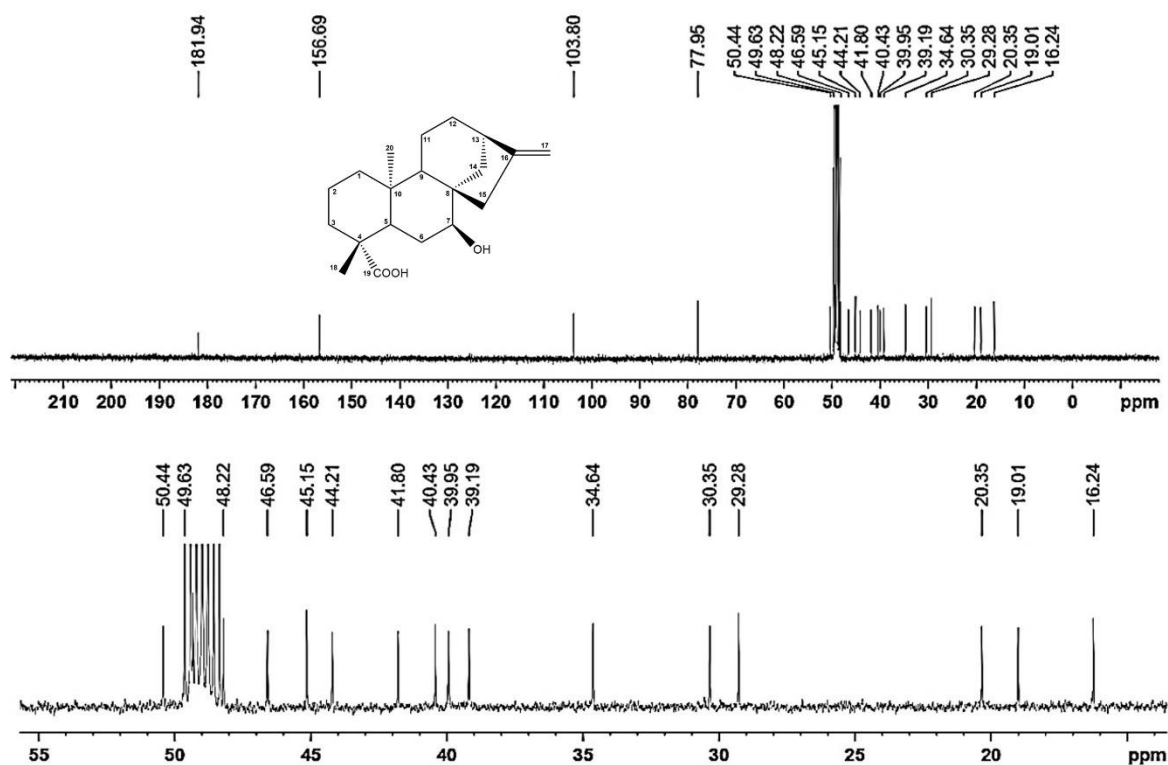
Após cinco dias de incubação do KA com *C. elegans* dois compostos foram formados (2 e 3).

### 3.2.1 Caracterização Estrutural por RMN de 1D e 2D do Análogo 2 (7OHKA) Obtido pela Biotransformação do KA por *C. elegans*

De acordo com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para o composto 2, foi possível observar sinais característicos do esqueleto caurano, entretanto os valores de deslocamentos químicos obtidos, foram diferentes do material de partida, indicando a modificação estrutural. Foi possível identificar a presença dos 20 átomos de carbono (Figura 5), estando presentes principalmente os sinais correspondentes ao carbono pertencente ao ácido carboxílico em C19 ( $\delta_c$  181,94 ppm), além da presença da dupla

ligação do carbono quaternário em C16 ( $\delta_c$  156,7 ppm) característicos do material de partida, KA.

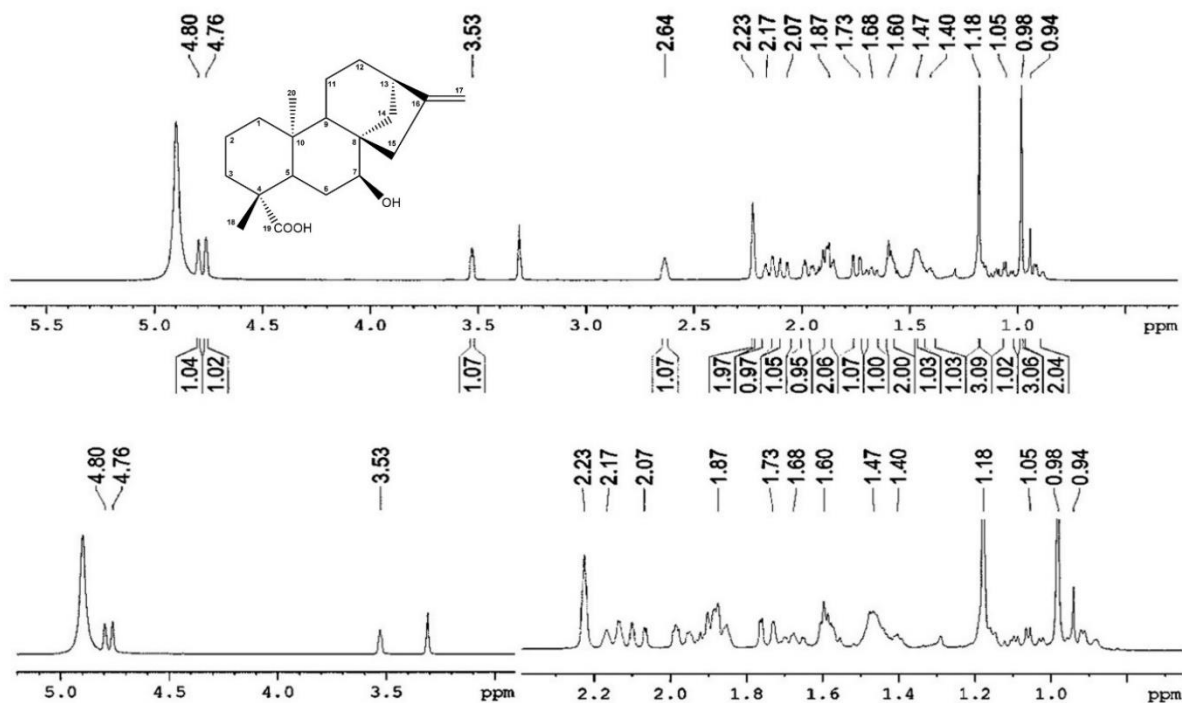
**Figura 5:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e ampliação da região de 0 a 60 ppm do composto biotransformado 7OHKA (2) (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  em ppm,).



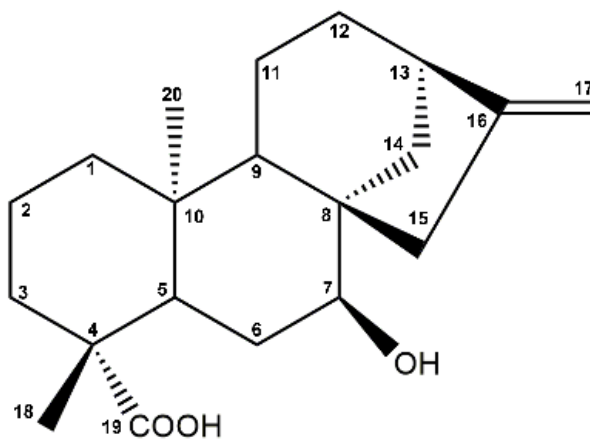
De acordo com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram determinados os  $\delta$  para cada hidrogênio presente, assim como suas respectivas multiplicidades (Figura 6).

Após a análise dos espectros de DEPT 90 e 135, foram atribuídos a presença de 2 metilas ( $-\text{CH}_3$ ), 9 carbonos metilênicos ( $-\text{CH}_2$ ), 4 carbonos metínicos ( $-\text{CH}$ ) e cinco carbonos quaternários, os resultados foram descritos na Tabela 6 e comparados com Tavepanich et al (2010), indicando que o composto 2 corresponde ao ácido 7-hidroxi caurenóico (7OHKA) (Figura 7).

**Figura 6:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto biotransformado 7OHKA (2) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  em ppm)



**Figura 7:** Estrutura do 7OHKA obtido pelo processo de biotransformação



**Fonte:** (TAVEEPANICH et al., 2010)

**Tabela 6:** Dados dos espectros 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\delta$  em ppm) e  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz), Dept 135 (+,- e Ausente) e Dept 90 (+ e Ausente) do 7OHKA (2) comparando com os dados da literatura em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

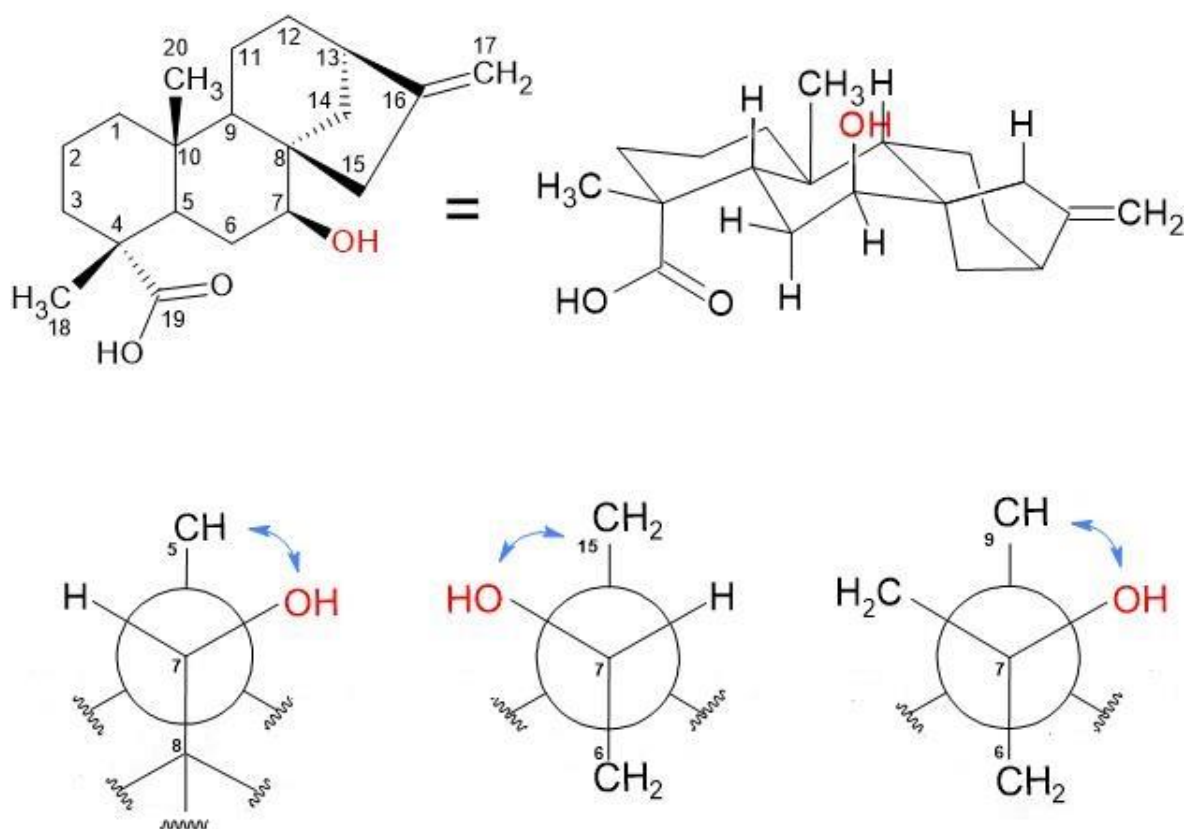
Posição	TAVEEPANICH et al (2010)		2			
	$\delta_c$	$\delta_H$ ( $J$ em Hz)	$\delta_c$	Dept 135	Dept 90	$\delta_H$ ( $J$ em Hz)
1	40,4	H-1a 0,95 <i>dt</i> ( $J=3,7;13,2$ ) H-1b 1,89 <i>sl</i> ( $J=13,2$ )	41,80	-	Ausente	H-1a 0,94 <i>m</i> H-1b 1,90 <i>m</i>
2	19,1	H-2a 1,46 <i>m</i> H-2b 1,46 <i>m</i>	20,35	-	Ausente	H-2 1,87 <i>m</i> H-2 1,40 <i>m</i>
3	37,8	H-3a 1,09 <i>dt</i> ( $J=4,2,13,2$ ) H-3b 2,17 <i>sl</i> ( $J=13,2$ )	39,2	-	Ausente	H-3a 1,05 <i>m</i> H-3b 2,17 <i>m</i>
4	43,2	-	44,21	Ausente	Ausente	-
5	49,1	1,50 <i>d</i> ( $J=3,4$ )	50,43	+	+	H-5 1,46 <i>m</i>
6	29,7	H-6a 2,02 <i>m</i> H-6b 2,15 <i>d</i> ( $J=12,2$ )	30,34	-	Ausente	H-6a 1,98 <i>m</i> $J=2,66$ H-6b 2,07 <i>m</i>
7	77,1	H-7a 3,34 <i>m</i>	77,95	+	+	H-7 3,53 <i>t</i> ( $J=2,66$ )
8	48,3	-	49,63	Ausente	Ausente	-
9	47,2	1,77 <i>dd</i> ( $J=2,0,12,9$ )	48,21	+	+	H-9 1,73 <i>m</i>
10	39,4	-	40,43	Ausente	Ausente	-
11	17,9	H-11a 1,63 <i>m</i> H-11b 1,63 <i>m</i>	19,0	-	Ausente	H-11 1,59 <i>m</i>
12	33,5	H-12a 1,50 <i>m</i> H-12b 1,68 <i>d</i> ( $J=2,0$ )	34,64	-	Ausente	H-12a 1,40 <i>m</i> H-12b 1,67 <i>m</i>
13	43,7	2,67 <i>sl</i>	45,15	+	+	2,64 <i>m</i>
14	38,7	H-14a 1,21 <i>m</i> H-14b 1,91 <i>m</i>	39,94	-	Ausente	H-14a 1,14 <i>m</i> H-14b 1,86 <i>m</i>
15	45,3	H-15a 2,27 <i>sl</i> H-15b 2,27 <i>sl</i>	46,60	-	Ausente	H-15 2,23 <i>m</i>
16	155,1	-	156,7	Ausente	Ausente	-

17	103,7	H-17a 4,79 s H-17b 4,83 s	103,8	-	Ausente	H-17a 4,79 s H-17b 4,76 s
18	28,7	1,21 s	29,3	+	Ausente	1,17 s
19	180,0	-	181,94	Ausente	Ausente	-
20	15,5	1,02 s	16,24	+	Ausente	0,98 s

**Legenda:** (+) sinal no espectro positivo; (-) sinal no espectro negativo; ( $\delta$ ) deslocamento químico em ppm; ( $J$ ) constante de acoplamento em Hz, (*s*) *singleto*, (*sl*) *singleto largo*, (*m*) *multipletto*; (*d*) *dupletto*; (*dd*) *duplo dupletto*, (*dt*) *duplo tripletto* e (*t*) *tripletto*

Quando comparados os sinais correspondentes do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 7OHKA e do KA, pode-se observar que a partir da introdução do grupamento hidroxila no C7, ocorre o deslocamento da absorção dos carbonos C6 ( $\delta\text{c}$  21,8 para 30,34 ppm) e C8 ( $\delta\text{c}$  44,2 para 49,63 ppm), deixando-os mais desblindados devido ao efeito indutivo. Também foi possível observar o deslocamento da absorção em C5 ( $\delta\text{c}$  57,02 para 50,43 ppm), C9 ( $\delta\text{c}$  55,07 para 48,21 ppm) e C15 ( $\delta\text{c}$  48,93 para 46,60 ppm), tornando esses carbonos mais blindados devido ao efeito  $\gamma$ -gauche (TAVEEPANICH et al., 2010).

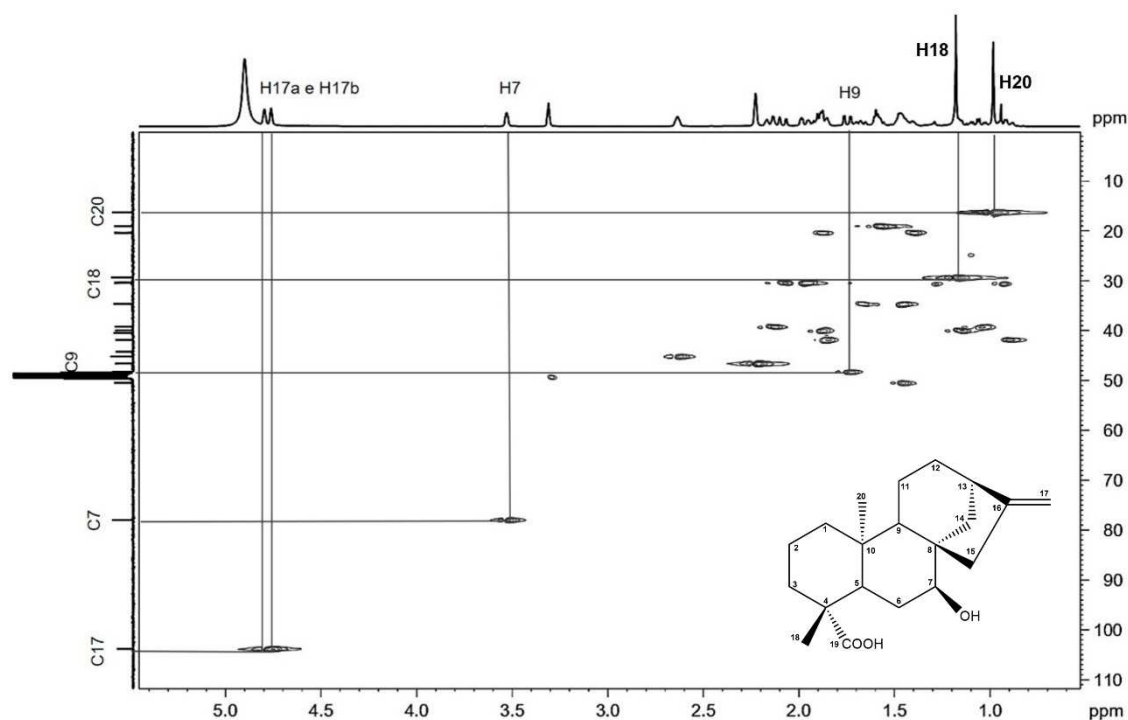
KA possui uma estrutura tetracíclica, ou seja, uma molécula estruturalmente rígida, o que leva a pouca liberdade conformacional. A distância entre o oxigênio da hidroxila e os carbonos  $\gamma$  (C5, C9 e C15) da molécula, são de 3 ligações, formando um ângulo diedro, favorecido pela rigidez da estrutura. A observação da blindagem desses carbonos pode ser explicada justamente pela introdução do grupamento hidroxila, onde os carbonos no perímetro do raio de van der Waals sofrem influência dos elétrons não compartilhados do oxigênio (LAMBERT; VAGENAS, 1981). Essa mudança no deslocamento químico na posição da hidroxilação em relação ao composto de partida não mostram diretamente a estereoquímica (pequena diferença entre os epímeros). No entanto, a hidroxilação axial em C-7 pode ser identificada pelo efeito  $\gamma$ -gauche, uma vez que esse tipo de interação entre substituintes hidroxil e carbono, ocorre uma blindagem substancial pelos prótons em carbonos  $\gamma$ , onde as interações  $\gamma$ -trans favorecem blindagem menores (HASAN; HEALEY; WATERMAN, 1982; HUTCHISON; LEWER; MACMILLAN, 1984).

**FIGURA 8:** Efeito  $\gamma$ -gauche observado em 7OHKA

Fonte: Próprio autor

Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{H}}$  3,52 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  77,95 ppm respectivamente, indicam a monohidroxilação no carbono 7. De acordo com a ampliação do espectro de HSQC, foi possível identificar principalmente o sinal de  $\delta$  3,53 ppm atribuído ao H-7 (onde houve a hidroxilação pelo processo de biotransformação por *C. elegans*) acoplado ao C7 ( $\delta_{\text{C}}$  77,95 ppm) e o H9 ( $\delta_{\text{H}}$  1,73 ppm) acoplado ao carbono terciário C9 ( $\delta_{\text{C}}$  48,21 ppm). Além disso, os sinais de  $\delta_{\text{H}}$  1,17 e 0,98 ppm foram atribuídos aos H-18 e H-20, acoplados aos seus respectivos carbonos metilênicos C18 e C20 ( $\delta_{\text{C}}$  29,3 e 16,24 ppm). No espectro também foram correlacionados os sinais de  $\delta$  4,79 e 4,83 ppm atribuídos aos H-17 (a e b) acoplados ao C17 ( $\delta_{\text{C}}$  103,8 ppm) (Figura 9).

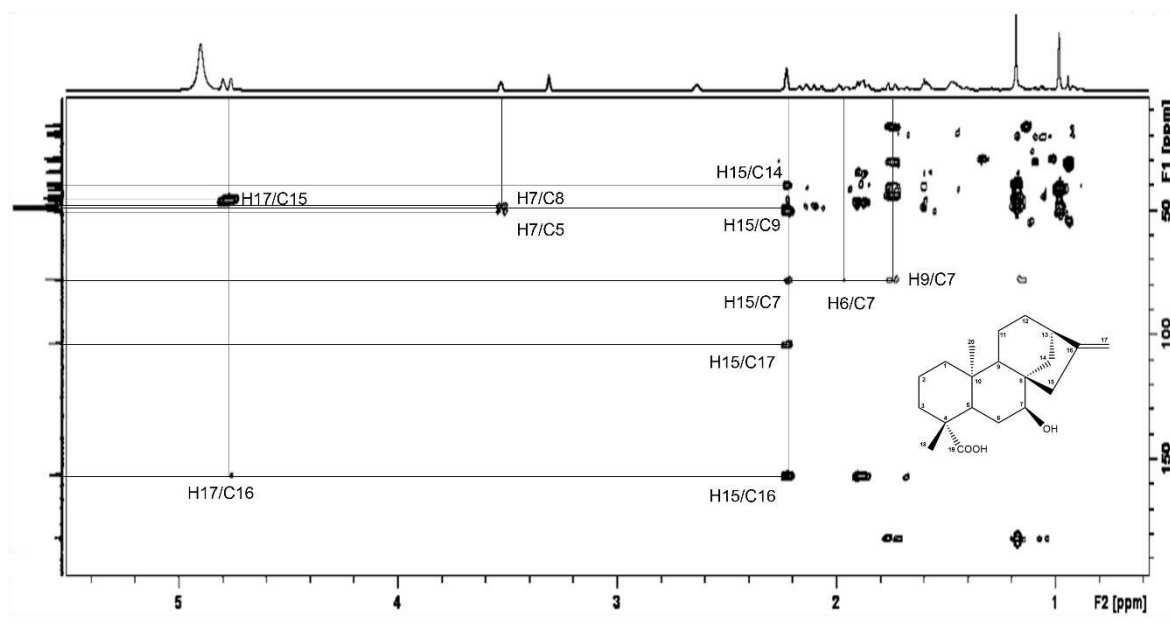
**Figura 9:** Ampliação do espectro 2D HSQC demonstrando os principais acoplamentos do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



No espectro de HMBC do 7OHKA, os principais acoplamentos que podem ser destacados, são os hidrogênios referentes a dupla ligação em  $\delta_H$  4,79 ppm (s) e 4,76 ppm (s) atribuídos ao carbono 17 ( $\delta_C$  103,8 ppm), correlacionam-se aos C15 e C16 com  $\delta_C$  46,6 e 103,8 ppm respectivamente. O hidrogênio em  $\delta_H$  3,53 ppm (t,  $J = 2,66$  Hz), referente ao carbono hidroxilado ( $\delta_C$  77,95 ppm), correlaciona-se aos C5 e C8 com  $\delta_C$  50,43 e 49,63 ppm respectivamente, apesar da proximidade dos sinais, fica nítido os dois sinais distintos. Também pode-se observar que o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  2,23 ppm (m) atribuído ao C15 ( $\delta_C$  46,60 ppm), está correlacionado com uma sequência de carbonos C7 ( $\delta_C$  77,95 ppm), C9 ( $\delta_C$  48,21 ppm), C14 ( $\delta_C$  39,94 ppm), C16 ( $\delta_C$  156,7 ppm) e C17 ( $\delta_C$  103,8 ppm).

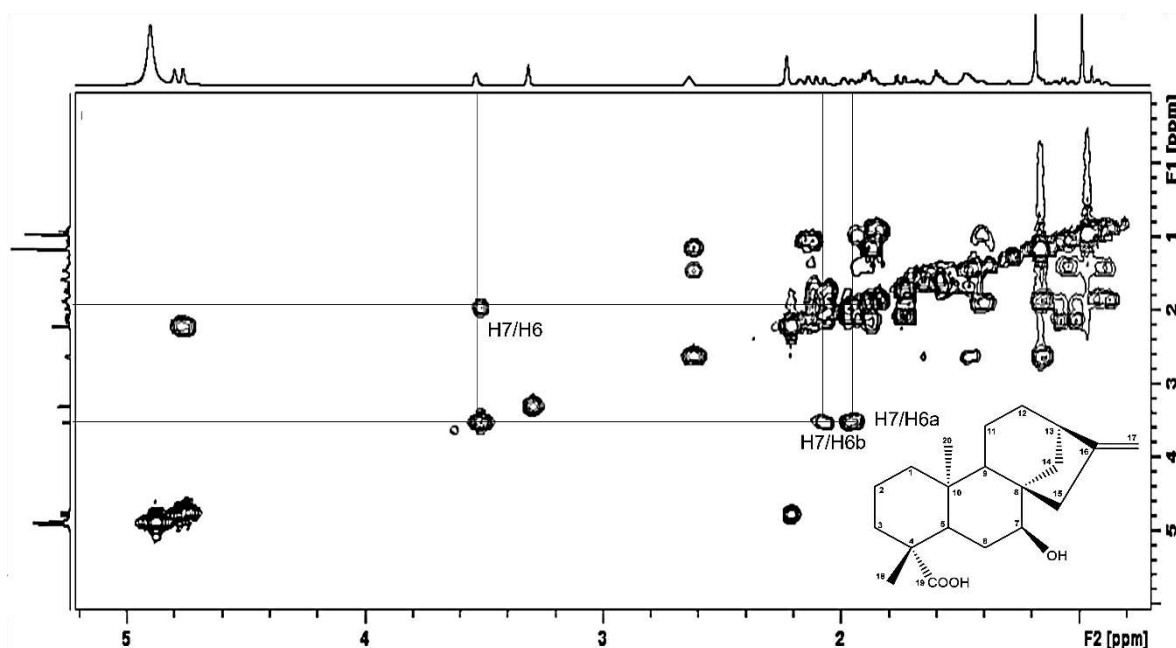
O hidrogênio  $\delta_H$  1,17 ppm (s) atribuído ao C18 ( $\delta_C$  29,3 ppm) apresenta correlação com C3 ( $\delta_C$  39,2 ppm), C4 ( $\delta_C$  44,21 ppm) e C19 ( $\delta_C$  181,94 ppm). Enquanto  $\delta_H$  0,98 ppm (s) atribuído C20 ( $\delta_C$  16,24 ppm), apresenta correlação com os carbonos C5 ( $\delta_C$  50,43 ppm), C9 ( $\delta_C$  48,21 ppm) e C10 ( $\delta_C$  40,43 ppm) (Figura 10).

**Figura 10:** Ampliação do espectro 2D HMBC do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



O conjunto de sinais obtidos pelo espectro COSY (Figura 11) permitem confirmar principalmente os acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_H$  3,53 ppm (*t*,  $J= 2,66$  Hz) do carbono hidroxilado, com os hidrogênios em  $\delta_H$  1,98 ppm (*m*,  $J=2,66$  Hz) e 2,07 ppm (*d*,  $J= 2,66$  Hz) referentes ao C6 ( $\delta_C$  30,34 ppm). A identificação de todos os dados espectrais do 7OHKA a partir dos RMN 2D (HMBC, COSY e NOESY) foram apresentados na Tabela 7 e o espectro NOESY foi apresentado no apêndice (Figura A1).

**Figura 11:** Ampliação do espectro 2D COSY do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



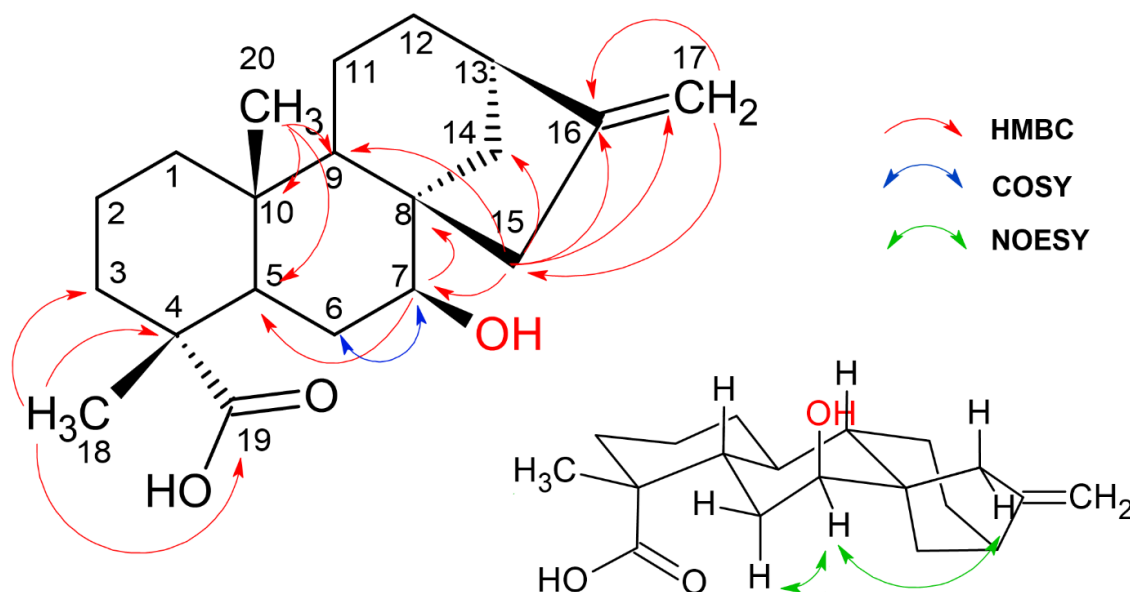
**Tabela 7:** Dados dos espectros de 2D correlacionados com os dados dos espectros RMN 1D de <sup>13</sup>C (100 MHz;  $\delta$  em ppm) e <sup>1</sup>H (400 MHz,  $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz), do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.

Posição	$\delta_H$ ( $J$ em Hz)	$\delta_C$	HMBC	COSY	NOESY
1	H-1a 0,94 <i>m</i> H-1b 1,90 <i>m</i>	41,80	C18 -	H-2, H-1a; H-2b,	
2	H-2a 1,87 <i>m</i> H-2b 1,40 <i>m</i>	20,35	C3 -	H-2b H2a	
3	H-3a 1,05 <i>m</i> H-3b 2,17 <i>m</i>	39,2 -	C2; C4 -	H-18 -	
4	-	44,21	-	-	-
5	H-5 1,46 <i>m</i>	50,43	-	-	H-1a
6	H-6a 1,98 <i>m</i> ( $J=2,66$ ) H-6b 2,07 <i>d</i> ( $J= 2,66$ )	30,34 -	- -	H-7 H-7, H-9	
7	H-7 3,53 <i>t</i> ( $J=2,66$ )	77,95	C5; C8	H-6a, H-6b	H-18, H-6; H-15
8	-	49,63	-	-	-
9	H-9 1,73 <i>m</i>	48,21	C6; C7; C10; C20	-	
10	-	40,43	-	-	-
11	H-11 1,59 <i>m</i>	19,0	C10; C9		
12	H-12a 1,40 <i>m</i>	34,64	-	H-14b	

	H-12b 1,67 m	-	C16	-	
13	2,63 m	45,15	-	H-14a, H-18	
14	H-14a 1,14 m	39,94	C7, C15	H-13	
	H-14b 1,86 m	-	C12, C15, C16	H-12a	
15	H-15 2,23 m	46,60	C7; C9; C16; C14; C17	H-17a H-17b	
16	-	156,7	-	-	-
17	H-17a 4,79 s	103,8	C15; C16	H-15	H-13
	H-17b 4,76 s	-	C15; C16	H-15	H-15
18	1,17 s	29,3	C3; C4; C19	H13, H-2a	H-7
19	-	181,94	-	-	-
20	0,98 s	16,24	C5; C9; C10	-	-

Os dados são compatíveis aos apresentados anteriormente na literatura, onde 7OHKA foi obtido da biotransformação do KA pelos fungos *Rhizopus oligosporus* (TAVEEPANICH et al., 2010) e *R. stolonifer* (SILVA et al., 1999). Na imagem abaixo (Figura 12) está esquematizado os principais sinais observados pelos RMN de 2D do 7OHKA.

**Figura 12:** Mapa de correlações dos RMN 2D (HMBC, COSY e NOESY) do 7OHKA

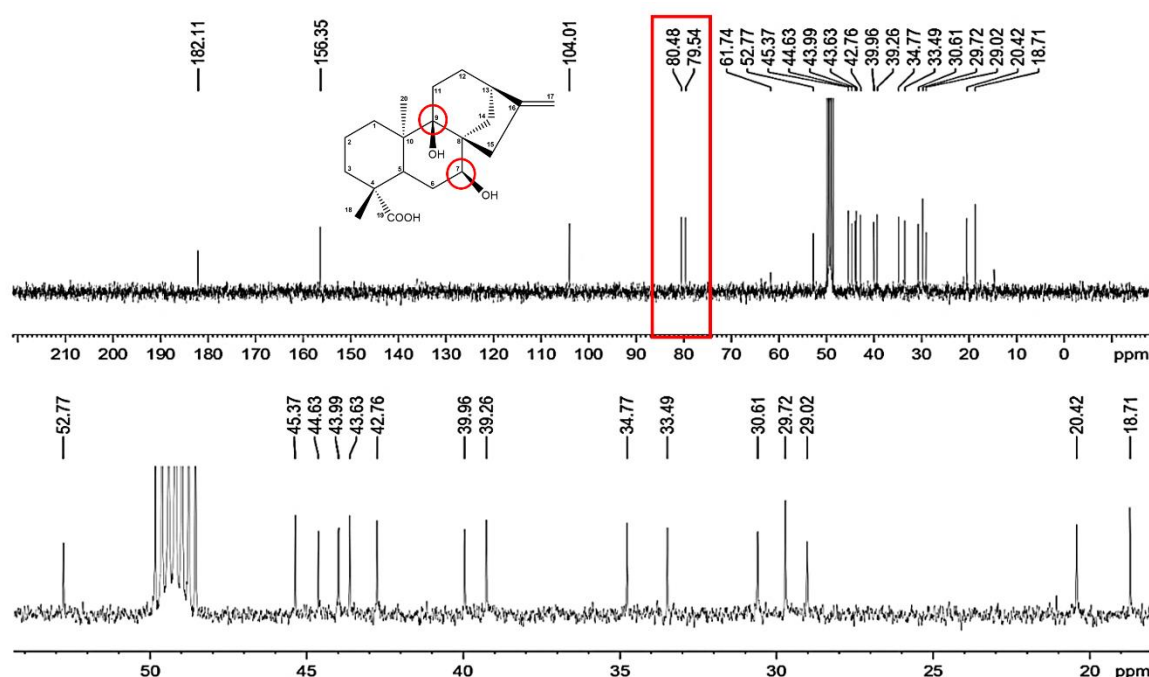


**Fonte:** Próprio autor

### 3.2.2 Caracterização Estrutural por RMN de 1D e 2D do Ânálogo 3 (7,9OHKA) Obtido pela Biotransformação do KA por *C. elegans*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto 3, foi possível identificar os sinais característicos do esqueleto caurano, apresentando diferença nos valores de deslocamentos químicos quando comparados ao material de partida, indicando a modificação estrutural. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar a presença dos 20 átomos de carbono, estando presentes os sinais característicos do material de partida, principalmente ao sinal correspondente ao ácido carboxílico ( $\delta_c$  182,1 ppm) do C19, além da presença da dupla ligação do carbono quaternário em C16 ( $\delta_c$  156,35 ppm). Também foi possível observar a presença de dois novos sinais em  $\delta_c$  79,54 ppm e  $\delta_c$  80,47 ppm, região característica de hidroxilação (Figura 13).

**Figura 13:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto biotransformado 7,9OHKA (3) (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 60 ppm.

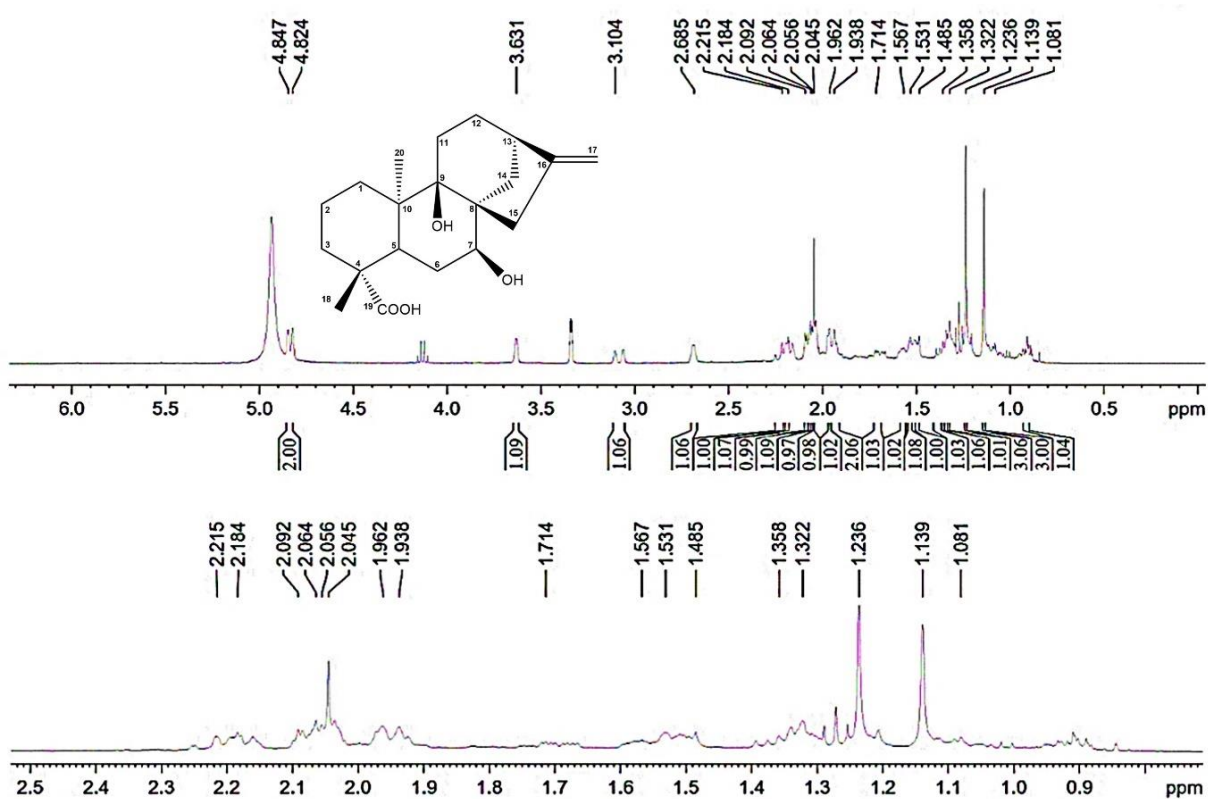


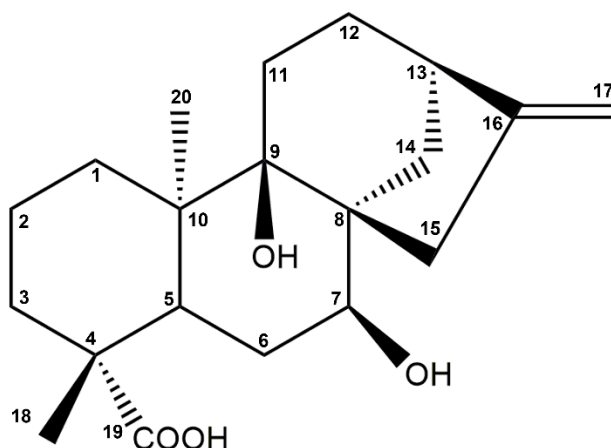
**Legenda:** Em vermelho estão destacados os sinais dos carbonos hidroxilados: C7 ( $\delta_c$  79,54 ppm) e C9 ( $\delta_c$  80,47 ppm)

De acordo com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram determinados os  $\delta$  para cada hidrogênio presente, assim como suas respectivas multiplicidades (Figura 14).

Além disso, foi possível observar no experimento DEPT-135 a presença de quatro grupos CH/CH<sub>3</sub> e oito CH<sub>2</sub> indicando que houve a hidroxilação pelo fungo em um grupo metileno (C7) e em um carbono metino (C9). Os dados espectroscópicos foram descritos na Tabela 8 e comparados com a literatura, corroborando com os estudos apresentados por Taveepanich et al., (2010). Assim, o composto 3 foi designado como ácido 7,9-diidroxicaurenóico (7,9OHKA) (Figura 15).

**Figura 14:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto biotransformado 7,9OHKA (3) (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ em ppm) apresentando a amplificação da região de 0 a 2,5 ppm.



**Figura 15:** Estrutura do 7,9OHKA obtido pelo processo de biotransformação

**Fonte:** Adaptado de (TAVEEPANICH et al., 2010)

**Tabela 8:** Dados dos espectros 1D de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\delta$  em ppm) e  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\delta$  em ppm), Dept 135 (+, - e Ausente) e Dept 90 (+ e Ausente) do 7,9OHKA (3) comparando com os dados da literatura em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Posição	TAVEEPANICH et al (2010)			3		
	$\delta_c$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_c$	Dept 135	Dept 90	$\delta_H$ (J em Hz)
1	38,4	H-1a 1,31 <i>m</i> H-1b 2,05 <i>m</i>	39,96	-	Ausente	H-1a 1,32 <i>m</i> H-1b 2,04 <i>m</i>
2	18,8	H-2a 1,49 <i>m</i> H-2b 1,49 <i>m</i>	20,42	-	Ausente	H-2a 1,48 <i>m</i> H-2b 1,95 <i>m</i>
3	37,7	H-3a 1,08 <i>m</i> H-3b 2,18 <i>d</i> (J=9,5)	39,26	-	Ausente	H-3a 1,08 <i>m</i> H-3b 2,18 <i>m</i>
4	43,1	-	44,63	Ausente	Ausente	-
5	42,0	2,05 <i>m</i>	43,63	+	+	2,06 <i>m</i>
6	29,0	H-6a 2,06 <i>m</i> H-6b 2,22 <i>m</i>	30,60	-	Ausente	H-6a 2,09 <i>m</i> H-6b 2,21 <i>m</i>
7	78,0	H-7a 3,63 <i>s</i>	79,54	+	+	H-7a 3,63 <i>m</i>
8	51,2	-	52,77	Ausente	Ausente	-
9	78,9	-	80,47	Ausente	Ausente	-
10	43,8	-	45,37	Ausente	Ausente	-

11	31,9	H-11a 1,51 <i>m</i> H-11b 1,94 <i>m</i>	33,49	-	Ausente	H-11a 1,53 <i>m</i> H-11b 1,93 <i>m</i>
12	33,2	H-12a 1,58 <i>m</i> H-12b 1,71 <i>ddt</i>	34,77	-	Ausente	H-12a 1,56 <i>m</i> H-12b 1,71 <i>m</i>
13	42,4	2,69 <i>sl</i>	43,99	+	+	2,68 <i>m</i>
14	27,4	H-14a 1,34 <i>m</i> H-14b 1,96 <i>m</i>	29,02	-	Ausente	H-14a 1,33 <i>m</i> H-14b 1,96 <i>m</i>
15	41,2	H-15a 2,06 <i>m</i> H-15b 3,08 <i>d</i> ( <i>J</i> = 17,4)	42,76	-	Ausente	H-15a 2,06 <i>m</i> H-15b 3,08 <i>d</i> ( <i>J</i> = 17,28)
16	154,8	-	156,35	Ausente	Ausente	-
17	102,4	H-17a 4,82 <i>s</i> H-17b 4,85 <i>s</i>	104,01	-	Ausente	H-17a 4,82 <i>s</i> H-17b 4,84 <i>s</i>
18	28,1	1,24 <i>s</i>	29,72	+	Ausente	1,23 <i>s</i>
19	180,6	-	182,10	Ausente	Ausente	-
20	17,1	1,14 <i>s</i>	18,71	+	Ausente	1,13 <i>s</i>

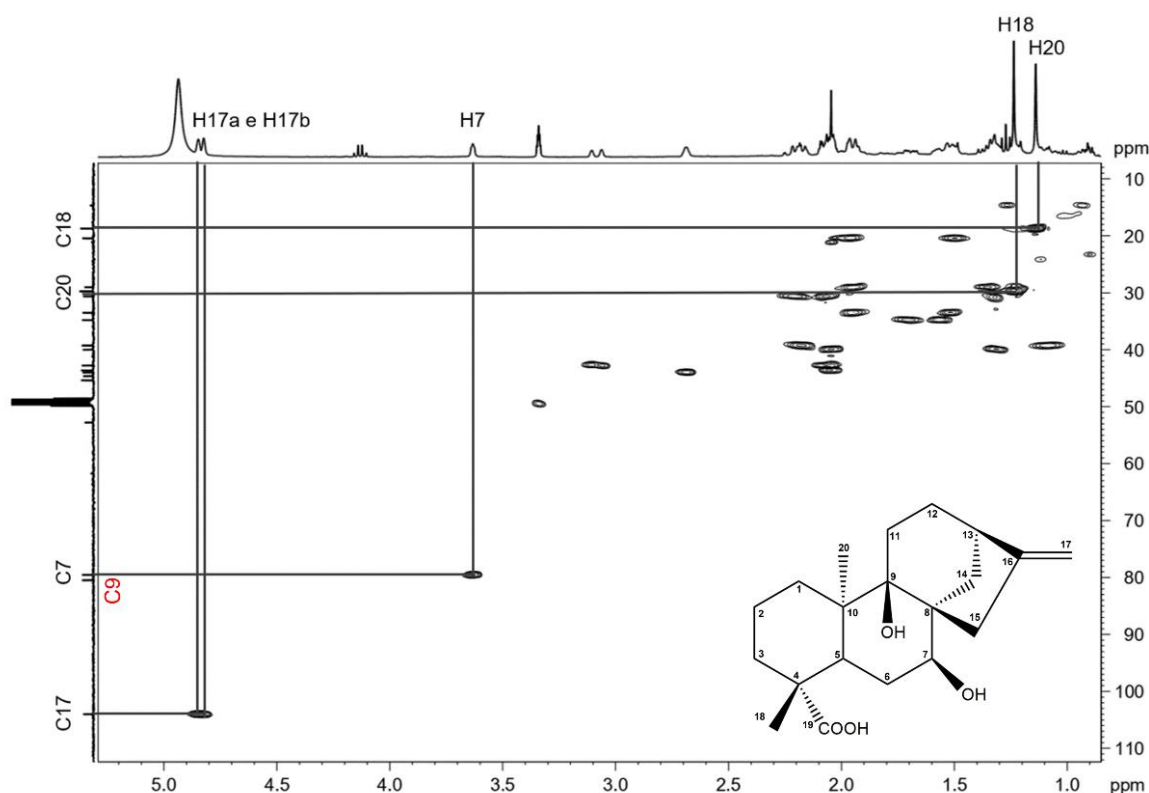
**Legenda:** (+) sinal no espectro positivo; (-) sinal no espectro negativo; ( $\delta$ ) deslocamento químico em ppm; (*J*) constante de acoplamento em Hz, (*s*) singlete; (*sl*) singlete largo; (*m*) multiplete; (*d*) duplete; (*ddt*) duplo duplo tripleto

A partir da hidroxilação em C7 ( $\delta_c$  79,54 ppm), foi possível observar a desblindagem dos carbonos adjacentes, onde em C6 houve uma mudança de deslocamento de  $\delta_c$  21,8 ppm para  $\delta_c$  30,6 ppm, e C8 foi de  $\delta_c$  44,2 ppm para  $\delta_c$  52,77 ppm), além da blindagem observada no C5 ( $\delta_c$  57,02 ppm para  $\delta_c$  43,63 ppm). A presença da segunda hidroxila foi confirmada pela observação de um novo sinal de carbono quaternário hidroxilado em  $\delta_c$  80,47 ppm, além da ausência do sinal do carbono metino atribuído ao C9. Foi possível observar o deslocamento dos sinais dos seguintes carbonos quando comparados ao material de partida: C11 ( $\delta_c$  11,4 ppm para  $\delta_c$  33,49 ppm), C10 ( $\delta_c$  39,64 ppm para  $\delta_c$  43,8 ppm) e C8 ( $\delta_c$  44,2 ppm para  $\delta_c$  52,77 ppm). Observamos uma desblindagem dos sinais, devido a proximidade destes carbonos com o novo grupamento hidroxila em C9, foi possível observar o efeito  $\gamma$ -gauche para C5 ( $\delta$  57,02 para  $\delta$  43,63 ppm) e C15 ( $\delta$  48,93 para  $\delta$  42,76 ppm).

Conforme a ampliação do espectro de RMN 2D HSQC apresentado abaixo (Figura 16) foi possível identificar principalmente o sinal de  $\delta_H$  3,63 ppm atribuído ao H7 (indicando a hidroxilação pelo processo de biotransformação por *C. elegans*)

acoplado ao C7 ( $\delta_c$  79,54 ppm). Assim como os sinais de  $\delta_H$  1,23 e 1,13 ppm atribuídos aos H18 e H20, acoplados aos seus respectivos carbonos metilênicos C18 e C20 ( $\delta_c$  29,72 e 18,71 ppm). Neste segundo composto biotransformado foi identificado uma nova hidroxilação no carbono 9, corroborando com o espectro HSQC, onde o sinal referente a correlação do C9 com o hidrogênio foi perdida, tornando-se um carbono quaternário.

**Figura 16:** Ampliação do espectro 2D HSQC demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.

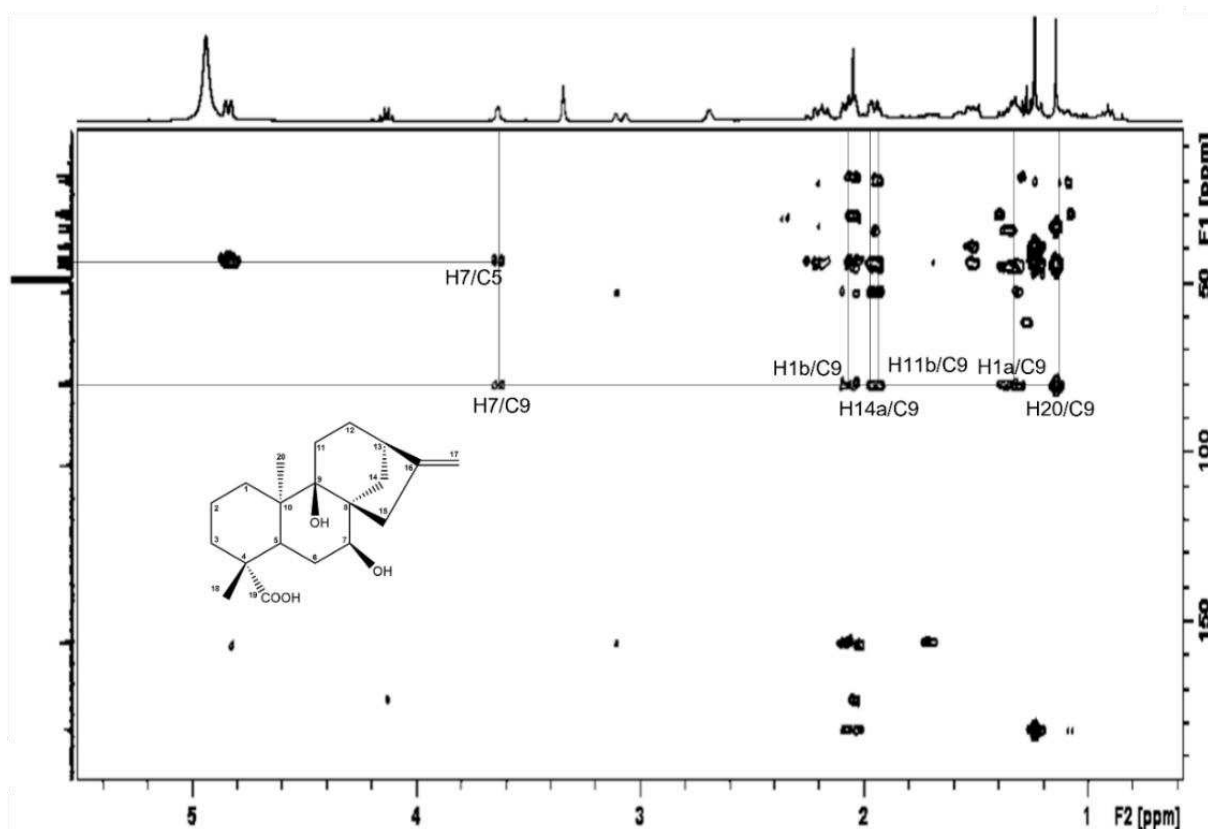


**Legenda:** Em vermelho está destacado o sinal de C9 ( $\delta_c$  80,47 ppm), indicando a perda da correlação com o hidrogênio devido a hidroxilação

De acordo com os principais acoplamentos no espectro de HMBC do 7,9OHKA destacam-se o singlete em  $\delta_H$  3,63 atribuído ao carbono hidroxilado ( $\delta_c$  79,54 ppm), correlaciona aos C5 e C9 com  $\delta_c$  43,63 e 80,47 ppm respectivamente. Também foi possível observar outras correlações ao carbono hidroxilado C9 ( $\delta_c$  80,47 ppm): H1a e H1b ( $\delta_H$  1,32 e 2,04 ppm), H14a ( $\delta_H$  1,33 ppm), H11b ( $\delta_H$  1,93 ppm), além

da correlação com o hidrogênio  $\delta_H$  1,13 ppm (s) atribuído ao C20 ( $\delta_C$  18,71 ppm) também apresentou correlação com C9 (Figura 17)

**Figura 17:** Ampliação do espectro 2D HMBC demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



A identificação de todos os dados espectrais do 7,9OHKA a partir dos RMN 2D (HMBC, COSY e NOESY) foram apresentados na Tabela 9 e os espectros COSY e NOESY foram apresentados nos apêndices (Figura A2 e A3).

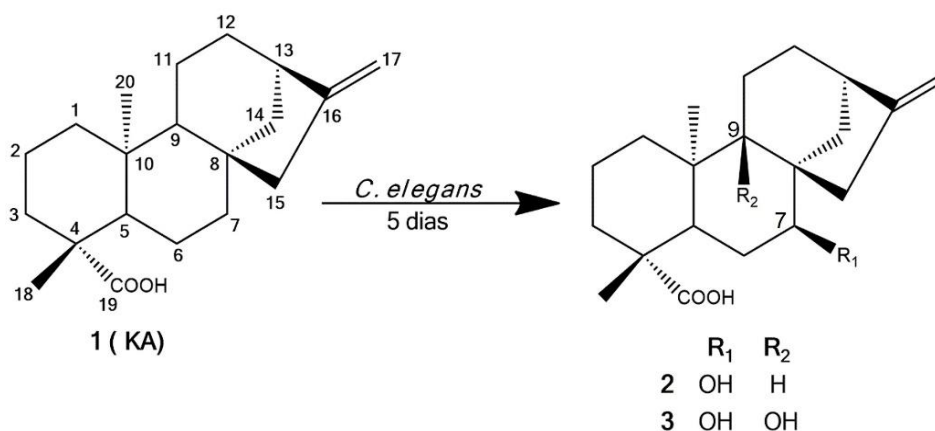
**Tabela 9:** Dados dos espectros de 2D correlacionados com os dados dos espectros RMN 1D de <sup>13</sup>C (100 MHz;  $\delta$  em ppm) e <sup>1</sup>H (400 MHz,  $\delta$  em ppm, *J* em Hz), do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.

Posição	$\delta_H$ ( <i>J</i> em Hz)	$\delta_C$	HMBC	COSY	NOESY
1	H-1a 1,32 <i>m</i>	39,96	C10, C8, C9 C20	H-1b	H-7, H-15b
	H-1b 2,04 <i>m</i>				
2	H-2a 1,48 <i>m</i>	20,42	C3, C4 C4		
	H-2b 1,95 <i>m</i>				

3	H-3a 1,08 <i>m</i> H-3b 2,18 <i>m</i>	39,26	C2, C18 C4		H-7
4	-	44,63	-		
5	2,06 <i>m</i>	43,63	C18, C19, C6, C4		H-15b, H-7
6	H-6a 2,09 <i>m</i> H-6b 2,21 <i>m</i>	30,6	C8, C19 C5		
7	H-7 3,63 <i>s</i>	79,54	C5, C9	H-15a	H-5, H-1a
8	-	52,77	-		
9	-	80,47	-		
10	-	45,37	-		
11	H-11a 1,53 <i>s/l</i> H-11b 1,93 <i>m</i>	33,49	C1 C8, C9		
12	H-12a 1,56 <i>m</i> H-12b 1,71 <i>m</i>	34,77	- C16		
13	2,68 <i>s/l</i>	43,99	-	H-14a	H-1a, H-12a
14	H-14a 1,33 <i>m</i> H-14b 1,96 <i>m</i>	29,02	C12 C8, C9		
15	H-15a 2,06 <i>m</i>	42,76	C8, C7, C16	H-15b, H-17, H-7	
	H-15b 3,08 <i>d</i> ( <i>J</i> = 17,28)		C8; C15, C16	H-15a	H-5, H-1a
16	-	156,3 5	-		
17	H-17a 4,82 <i>s</i>	104,0 1	C13; C16	H-15a	
	H-17b 4,84 <i>s</i>		C13; C16		H-13
18	1,23 <i>s</i>	29,72	C2, C3, C4, C19		H-5
19	-	182,1	-		
20	1,13 <i>s</i>	18,71	C9, C10, C11		H-3b

O processo de introdução de grupos hidroxila na estrutura do KA (Figura 18) pela síntese clássica apresenta maiores dificuldades, especialmente em carbonos desativados, quando comparados ao processo de biotransformação fúngica (PECHWANG et al., 2010).

**Figura 18:** Representação estrutural dos análogos obtidos a partir da biotransformação do KA

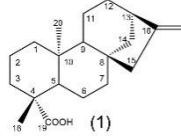
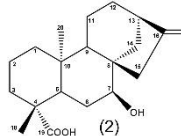
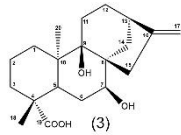


**Fonte:** Próprio autor

### 3.3 ANÁLISE *IN SÍLICO* DOS COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS

Os compostos biotransformados (7OHKA e 7,9OHKA) foram submetidos a uma análise teórica por meio do estudo *in silico*, a fim de prever a segurança e eficácia de sua ação por administração via oral. De acordo com os dados observados, 7OHKA e 7,9OHKA não violaram as regras propostas por Veber e Lipinski, apresentando alta probabilidade de absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral e estabilidade metabólica similar a de um fármaco comercialmente aprovado (Tabela 10). A “R5”, tem por objetivo estimar parâmetros farmacocinéticos (lipofilicidade [log P], massa molecular [PM], grupos aceptores de ligação de hidrogênio [H-Acc/nON], número de grupos doadores de hidrogênio [H-Don/nOHNH] e área da superfície polar molecular [tPSA]) predizendo a influência da estrutura química na absorção de um composto via oral (KELLER; PICHOTA; YIN, 2006; LIPINSKI, 2004; VEBER et al., 2002). De acordo com Gilbert (2014), os fármacos glucantime e AmB, principais fármacos para o tratamento da leishmaniose, não obedecem a todos os parâmetros determinados pelo estudo *in silico*.

**Tabela 10:** Dados *in silico* para o tratamento com KA (1), 7OHKA (2) e 7,9OHKA (3)

Compostos	Regras de Veber			Regras de Lipinski				Total de Violações
	H-Acc + H-Don ( $\leq 12$ )	RB ( $\leq 10$ )	tPSA ( $\leq 140 \text{ \AA}^2$ )	PM ( $\text{g.mol}^{-1}$ ) ( $\leq 500$ ):	Log P ( $\leq 5$ )	nON ( $\leq 10$ )	nOH NH ( $\leq 5$ )	
 (1)	3	1	37,30	302,46	4,67	2	1	0
 (2)	5	1	57,53	318,45	3,44	3	2	0
 (3)	7	1	77,75	334,46	2,81	4	3	0

**Legenda:** PM: Peso Molecular; Log P: log do coeficiente de partição; H-Acc/nON: número de aceptores de ligação de hidrogênio; H-Don/nOHNH: número de doadores de ligação de hidrogênio; RB: número de ligações rotacionais e tPSA: área de superfície polar molecular.

A verificação das propriedades do ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) para candidatos a fármacos, é amplamente aceita no processo inicial de desenvolvimento, auxiliando na triagem e otimização de moléculas (SHEN et al., 2010). De acordo com as propriedades do ADMET realizadas por meio do admetSAR (Tabela 11), ambos os compostos (7OHKA e 7,9OHKA) apresentaram características similares: não são carcinogênicos, não são mutagênicos, fracos bloqueadores hERG, possuem alta solubilidade aquosa, alta absorção intestinal humana, alta permeabilidade celular de Caco-2, penetração na barreira hematoencefálica além de não inibir as principais isoformas do citocromo P450 (CYP450) (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4) e apresentar baixa promiscuidade inibitória do CYP.

**Tabela 11:** ADME/TOX e avaliação de parâmetro farmacológico previstos dos compostos KA, 7OHKA e 7,9OHKA utilizando a ferramenta admetSAR

Propriedades ADMET	KA	7OHKA	7,9OHKA	Referência
<b>Absorção</b>				
<b>Permeação da barreira hematoencefálica</b>	Sim	Sim	Sim	(SHEN et al., 2010)
<b>Absorção Intestinal Humana</b>	Alta	Alta	Alta	(SHEN et al., 2010)
<b>Permeabilidade Caco-2</b>	Alta	Alta	Alta	(PHAM THE et al., 2011)
<b>Solubilidade aquosa prevista</b>	Sim	Sim	Sim	(WANG et al., 2007)
<b>Distribuição</b>				
<b>Localização subcelular</b>	Mitocôndria	Mitocôndria	Mitocôndria	
<b>Metabolismo</b>				
<b>CYP450 2C9</b>	Não Inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	(CARBON-MANGELS; HUTTER, 2011)
<b>CYP450 2D6</b>	Não Inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	(CARBON-MANGELS; HUTTER, 2011)
<b>CYP450 1A2</b>	Não Inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	(CHENG et al., 2011a)
<b>CYP450 2C19</b>	Não Inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	(CHENG et al., 2011a)
<b>CYP450 3A4</b>	Não Inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	(CHENG et al., 2011a)
<b>Promiscuidade inibitória de CYP</b>	Baixa	Baixa	Baixa	(CHENG et al., 2011b)
<b>Toxicidade</b>				
<b>Inibição de hERG</b>	Fraco inibidor	Fraco inibidor	Fraco inibidor	(MARCHESE ROBINSON; GLEN; MITCHELL, 2011)
<b>Carcinogenicidade</b>	Não Carcinogênico	Não Carcinogênico	Não Carcinogênico	(LAGUNIN et al., 2009)
<b>Toxicidade AMES</b>	Não mutagênico	Não mutagênico	Não Mutagênico	(HANSEN et al., 2009)

**Legenda:** ADMET: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade; hERG: do human *Ether-à-go-go-Related Gene*; CYP do inglês *Cytochrome*; AMES: *ensaio de mutação reversa bacteriana*; Caco-2: células de adenocarcinoma de cólon humano

Um dos principais objetivos no desenvolvimento de um novo fármaco é conseguir unir a alta seletividade de um alvo terapêutico, com menores efeitos colaterais ou reações adversas. O grau de promiscuidade de uma molécula refere-se ao nível de violação da especificidade, ou seja, quão diversa é a atividade promíscua

de uma determinada enzima e quão diferente são as funções nativas e promíscuas (CHENG et al., 2011b). O metabolismo de fármacos pelas enzimas do CYP450 (que são responsáveis por cerca de 90 % das reações metabólicas oxidativas), e a promiscuidade de drogas com as diferentes isoformas de CYP450 tem efeitos importantes na ocorrência de interações medicamentosas (NATH et al., 2010). Além disso, quanto mais isoformas de CYP uma molécula é capaz de inibir, maior a probabilidade de estar envolvida com a “interação fármaco-fármaco” com muitos outros medicamentos (HOPKINS, 2008). Assim, os resultados mostram que 7OHKA e 7,9OHKA apresentaram baixa promiscuidade inibitória de CYP.

De acordo com a literatura aproximadamente 90 % de todos os medicamentos comercializados são administrados via oral, desses medicamentos, 10 % falham no desenvolvimento devido a erros nas propriedades farmacocinéticas (CALDWELL et al., 2009). O ensaio de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) é considerado o padrão ouro para testes de permeabilidade de compostos, amplamente utilizado na descoberta de drogas para a previsão de permeabilidade intestinal humana. Assim, as previsões *in silico* para a permeabilidade Caco-2 pode ser útil no entendimento das características farmacocinéticas de uma molécula (PHAM THE et al., 2011). Os resultados mostraram que 7OHKA e 7,9OHKA apresentaram alta permeabilidade de Caco-2.

Outro parâmetro importante, predito por ADMET é referente ao bloqueio medicamentoso do gene de hERG (do inglês *human Ether-à-go-go-Related Gene*), devido suas implicações para a cardiotoxicidade, geralmente relacionados à arritmias ocasionadas pela interação dos fármacos com o canal de potássio cardíaco denominado hERG (MARCHESE ROBINSON; GLEN; MITCHELL, 2011). Ambos compostos biotransformados apresentaram menor probabilidade de bloqueio do canal de hERG.

A maioria dos fármacos não são absorvidos pela membrana cerebral devido ao impedimento causado pela barreira hematoencefálica. Alguns medicamentos são capazes de cruzar essa barreira por meio de difusão livre mediada por lipídios, desde que o medicamento tenha peso molecular <400 Da e alta lipossolubilidade, ou seja, baixa ligação de hidrogênio (<8). No entanto, essas características não são comuns na grande maioria dos medicamentos compostos por moléculas pequenas (PARDRIDGE, 2012). Apesar de fundamentais para a homeostase do sistema nervoso central, a presença dessa barreira é um fator limitante

no desenvolvimento de fármacos efetivos para o tratamento de doenças como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia, tumores cerebrais, entre outras (PARDRIDGE, 2012). Compostos que possuam uma boa penetração pela barreira cerebral, alcançando concentrações terapêuticas no sistema nervoso central são fundamentais para o entendimento dos mecanismos que envolvem o influxo e o efluxo através da barreira hematoencefálica (RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013). 7OHKA e 7,9OHKA são compostos estruturalmente favoráveis para a *delivery* cerebral, uma vez que apresentam capacidade *in silico* de permear a barreira hematoencefálica.

A importância da mitocôndria na fisiologia celular decorre de suas funções essenciais na bioenergética, metabolismo e biossíntese apresentando diferentes alvos promissores, como por exemplo, os complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, enzimas associadas à cadeia respiratória e atividades metabólicas na mitocôndria. São exemplos de alvos bastante explorados no estudo de desenvolvimento de compostos antiparasitário (MONZOTE; GILLE, 2010)

De acordo com os resultados apresentados na tabela 11, ambos compostos biotransformados apresentam características *in silico* favoráveis.

#### 3.4 COMPOSTOS BIOTRANSFORMADOS EXERCEM BAIXA CITOTOXICIDADE EM J774A.1

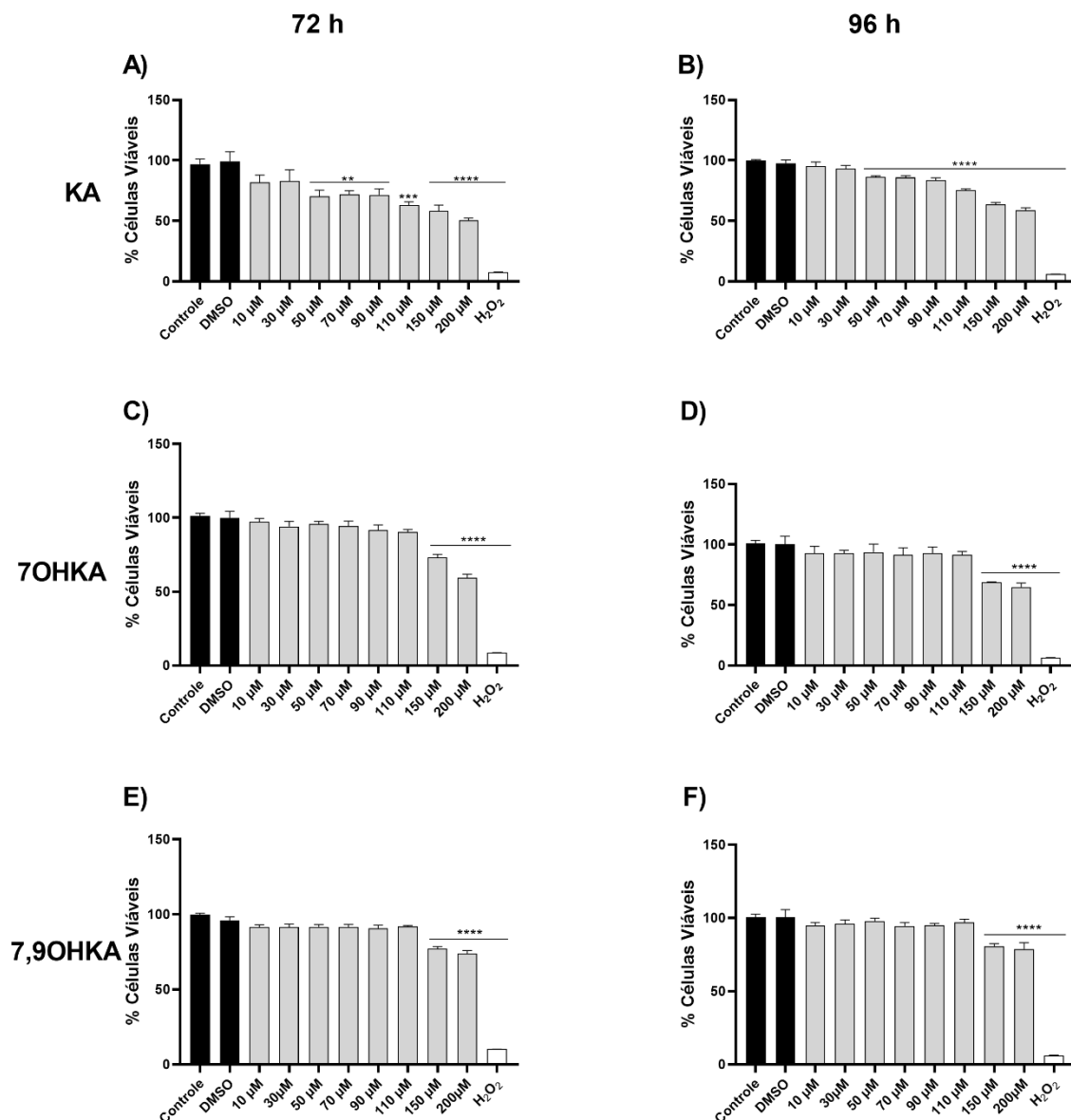
Os macrófagos, embora sejam células hospedeiras de parasitos do gênero *Leishmania*, também são as principais responsáveis pela eliminação destes parasitos (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018b). Por isso, avaliar o potencial de moléculas candidatas ao tratamento da leishmaniose sobre macrófagos é um dos passos fundamentais no processo de *drug discovery* (DON; IOSET, 2014). Neste contexto, foi realizada a avaliação da atividade citotóxica sobre linhagem de macrófagos murinos J774A.1 utilizando além do KA seus análogos obtidos através do processo de biotransformação, 7OHKA e 7,9OHKA.

As células tratadas com KA apresentaram redução superior a 25 % na viabilidade a partir de 50  $\mu\text{M}$  em ambos os períodos testados de 72 h ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 19A) e 96 h ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 19B). Já o tratamento com 7OHKA e 7,9OHKA nas concentrações de 10-110  $\mu\text{M}$  não diferiram do grupo sem tratamento ( $p > 0,05$ ), exceto nas maiores concentrações testadas (150 e 200  $\mu\text{M}$ ), as quais comprometeram

a viabilidade dessas células em ambos períodos testados de 72 (Figura 19C e E) e 96 h (Figura 19D e F) ( $p \leq 0,0001$ ).

O  $CC_{50}$  dos compostos KA, 7OHKA e 7,9OHKA em macrófagos murinos foram de 271,9 ( $\pm 0,1$ ), 232,5 ( $\pm 0,02$ ) e 618,2 ( $\pm 0,1$ )  $\mu\text{M}$ , em 72 h e de 256,1 ( $\pm 0,03$ ), 279,6 ( $\pm 0,07$ ) e 380 ( $\pm 0,07$ )  $\mu\text{M}$ , em 96 h, respectivamente.

**Figura 19:** Viabilidade de células J774A.1 tratadas com KA, 7OHKA e 7,9OHKA.



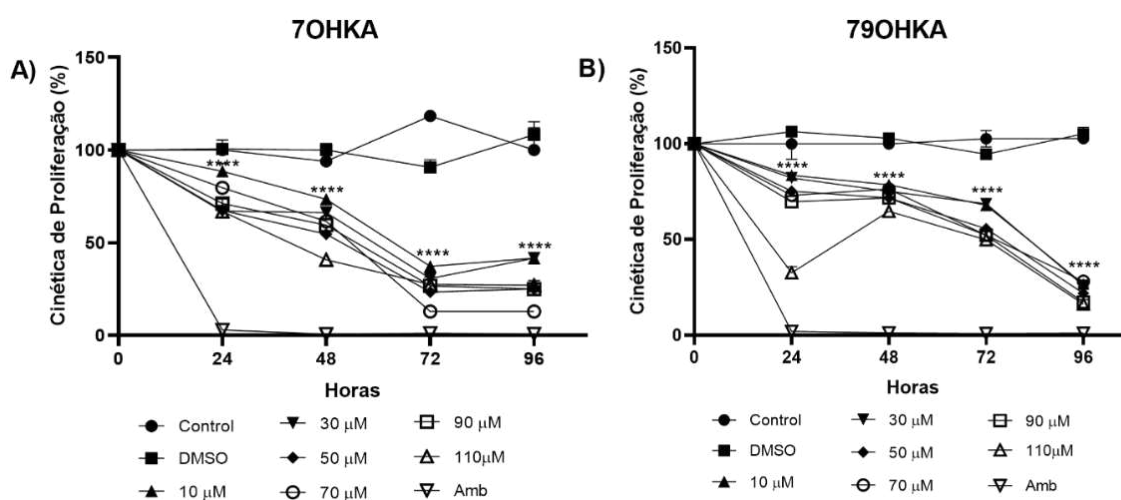
**Legenda:** J774A.1 foram tratados com A) KA, C) 7OHKA e E) 7,9OHKA por 72h, B) KA, D) 7OHKA e F) 7,9OHKA por 96 h nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 150 e 200  $\mu\text{M}$  e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Controle negativo (meio RPMI), DMSO 0,01 % (veículo) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle positivo). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizadas em triplicata. Diferença significativa em relação ao controle \*\* ( $p < 0,01$ ) \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 3.5 CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADAS COM 7OHKA E 79OHKA

No presente estudo foi avaliado o potencial leishmanicida do tratamento com os compostos biotransformados. Foi possível verificar que ambos compostos inibiram diretamente a proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 19). De acordo com os resultados, 7OHKA (Figura 20A), reduziu a proliferação das formas promastigotas em todas as concentrações (10, 30, 50, 70, 90 e 110  $\mu\text{M}$ ) e em todos os tempos testados (24, 48, 72 e 96 h). Nos tempos de 72 e 96 h foram encontradas as maiores reduções absolutas de viabilidade, com eliminação de mais de 70 % dos parasitos. Detalhadamente, após 72 h de tratamento, as concentrações de 30, 50, 70, 90 e 110  $\mu\text{M}$  reduziram a proliferação das formas promastigotas em 87,6; 94,9; 95,5 e 91,7 % ( $p \leq 0,0001$ ), enquanto após 96 h de tratamento, os valores de redução nas mesmas concentrações foram 75; 75; 75 e 73 % ( $p \leq 0,0001$ ), respectivamente.

Da mesma forma, o composto 7,9OHKA (Figura 20B) também promoveu efeitos semelhantes na eliminação parasitária em todas as concentrações (10, 30, 50, 70, 90 e 110  $\mu\text{M}$ ) e tempos (24, 48, 72 e 96 h) testados. Após 72 h de tratamento com 7,9OHKA, foi observado uma redução de 34,8; 33,9; 47; 50,4; 50,4 e 52,7% respectivamente ( $p \leq 0,0001$ ) e, após 96 h de tratamento de 76; 76,7; 81; 73,7; 83,6 e 78,4 % ( $p \leq 0,0001$ ).

**Figura 20:** Efeito do tratamento com os compostos biotransformados 7OHKA e 7,9OHKA na viabilidade de *L. amazonensis*



**Legenda:** Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações (10, 30, 50, 70, 90 e 110  $\mu\text{M}$ ) de A) 7OHKA e B) 7,9OHKA e a proliferação das promastigotas foi avaliada após 24, 48, 72 e 96 h. Controle (meio M199), DMSO (veículo) 0,01 %, Amb 1  $\mu\text{M}$  (controle positivo). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizadas em duplicata. \*\*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,0001$ ).

Os derivados cauranos hidroxilados são de interesse nesses estudos, uma vez que esses compostos apresentam atividade leishmanicida superiores quando comparados ao material de partida. De acordo com a literatura foi verificado que KA possui atividade antiprotozoária (KIAN et al., 2018; MACRI et al., 2014; MIRANDA et al., 2015). dos Santos et al., (2013), mostraram que KA isolado de oleoresinas de *Copaifera officinales*, apresentou atividade contra formas promastigotas em 24 h de tratamento ( $\text{IC}_{50}$   $28 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ) e amastigotas axênicas ( $\text{IC}_{50}$   $3,5 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ) de *L. amazonensis*, além de causar aumentos significativos na permeabilidade da membrana plasmática e despolarização da membrana mitocondrial do protozoário. No entanto, o composto também apresentou toxicidade considerável para eritrócitos de mamíferos ( $\text{CC}_{50}$   $140 \pm 17,0 \mu\text{g/mL}$ ).

Em outro trabalho realizado com KA também isolado da oleoresina de *Copaifera spp.*, Vargas e colaboradores (2015) verificaram a atividade citotóxica desse diterpeno sobre diferentes células normais e tumorais. Os resultados mostraram que KA apresentou atividade hemolítica de 61.7 % sobre eritrócitos murinos ( $\text{CC}_{50}$  de  $86.7 \pm 4.1 \mu\text{M}$ ), no entanto, neste estudo o composto não foi tóxico para fibroblastos murinos 3T3-L1, linfócitos humanos e macrófagos murinos J774A.1 após 24 h de tratamento (7,8 - 500  $\mu\text{M}$ ) apresentando  $\text{CC}_{50}$  inferior a 100  $\mu\text{M}$ . Além disso, de acordo com os autores, o composto não apresentou mudanças significativas na viabilidade das células de linhagem tumoral ([AGP-01 (gástrica)]; [HCT116 (colorretal)], [MCF07 (câncer de mama)], [NIHOVCAR (ovário)], [SKAMELL-4 (melanoma)] e [SF295 (glioblastoma humano)]) após 72 h de tratamento com 20  $\mu\text{M}$  de KA.

Miranda et al., (2015), investigaram o efeito antiprotozoário *in vitro*, assim como os mecanismos envolvidos na morte do parasito *L. amazonensis* tratados com KA isolados das raízes de *S. trilobata*. De acordo com os autores, o composto exibiu atividade leishmanicida direta sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 120 h com 24 h de pré-tratamento, sendo capaz de reduzir em 28,2; 45,8 e 51,5 % a

proliferação das formas promastigotas nas concentrações de 50, 70 e 90  $\mu\text{M}$ . KA também reduziu a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados e o número intracelular de formas amastigotas, através do aumento nos níveis de NO, IL-1 $\beta$  e receptor tipo NOD (NLRP12), culminando na ativação dos macrófagos e eliminação do parasito intracelular. Os autores não determinaram os valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> neste estudo.

Na tabela 12 estão representados os valores obtidos de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e IS dos compostos biotransformados 7OHKA e 7,9OHKA após 72 e 96 h, além dos valores de CC<sub>50</sub> em 72 e 96 h do KA no intuito de comparar os resultados de citotoxicidade do material de partida e seus análogos.

**Tabela 12:** CC<sub>50</sub> (72 e 96 h), IC<sub>50</sub> (72 e 96 h) e IS do KA, 7OHKA e 7,9OHKA.

	CC <sub>50</sub> 72 h ( $\mu\text{M}$ )	CC <sub>50</sub> 96 h ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> 72 h ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> 96 h ( $\mu\text{M}$ )	IS 72 h	IS 96 h
<b>KA</b>	271,9 $\pm$ 0,10	256,1 $\pm$ 0,03	-	-	-	-
<b>7OHKA</b>	232,5 $\pm$ 0,02	279,6 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,36	5,62 $\pm$ 0,18	147,1	49,2
<b>7,9OHKA</b>	618,2 $\pm$ 0,10	380 $\pm$ 0,07	110,2 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,46	5,6	655,8

**Legenda:** CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica do composto capaz de inibir 50 % da viabilidade celular; IC<sub>50</sub>: Concentração do composto capaz de inibir 50 % do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*; IS: Índice de seletividade (razão entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>)

De acordo com a literatura, o cálculo referente ao índice de seletividade (IS) pode ser uma análise complementar na obtenção de resultados mais completos sobre a citotoxicidade de um composto, ou seja, que apresente atividade contra protozoário sem causar danos celulares. De acordo com os critérios de seleção definidos pela DNDi (do inglês *Drugs for Neglected Diseases initiative*) em relação ao tratamento da Leishmaniose visceral, para um composto ser considerado efetivo e progrida para a próxima fase de desenvolvimento de um medicamento, o valor de IS deve ser >10, indicando sua maior atividade contra o parasito em comparação aos seus efeitos sobre as células hospedeiras (DON; IOSET, 2014). Dessa forma, 7OHKA e 7,9OHKA apresentaram valores consideráveis de acordo com a tabela 12, onde 7OHKA apresentou melhor resultado de IS (147,1) em 72 h de tratamento, enquanto 7,9OHKA foi melhor após 96 h de tratamento (IS 655,8).

Os compostos 7OHKA e 7,9OHKA obtidos pela biotransformação com *C. elegans* já foram previamente relatados na literatura a partir deste mesmo processo utilizando diferentes espécies fúngicas (OLIVEIRA et al., 2020; SILVA et al., 1999; TAVEEPANICH et al., 2010), no entanto as investigações referentes as suas atividades biológicas foram pouco exploradas. No estudo realizado por Da Costa et al., (2018), realizaram a biotransformação de KA por *A. terreus*, e avaliaram a citotoxicidade de 7OHKA sobre linhagem tumoral de câncer de mama (MCF-7), seguidos por uma análise multivariada de estrutura atividade. De acordo com os resultados, o 7OHKA apresentou valores de IC<sub>50</sub> (141 µM/L) e pIC<sub>50</sub> (3,85 mol/L), além de inferir que a atividade contra MCF-7 está relacionada às energias logP e HOMO e HOMO<sup>-1</sup>, de modo que quanto mais alta essas energias, maior a atividade do composto, indicando que a interação com o alvo ocorre principalmente pelo deslocamento de carga dos derivados do KA para a célula alvo.

Com relação à atividade antimicrobiana, o composto 7OHKA isolado das partes aéreas de *Senecio erectitoides* foi relatado por apresentar atividade sobre as espécies bacterianas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e espécie de fungo *Candida albicans* (NDOM et al., 2010).

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que 7OHKA e 7,9OHKA foram mais promissores sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* quando comparados ao seu material de partida KA, sem gerar efeitos citotóxicos em macrófagos murinos em baixas concentrações, sugerindo que esses diterpenos cauranos podem ser considerados candidatos importantes para futuras investigações para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da leishmaniose.

## 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, a utilização do fungo *C. elegans* para o processo de biotransformação foi eficaz na obtenção de compostos hidroxilados em carbonos considerados desativados. 7OHKA e 7,9OHKA, não apresentaram violação aos parâmetros determinados no estudo *in silico*, além de apresentaram potencial efeito anti-*Leishmania in vitro* sobre formas promastigotas, e citotoxicidade seletiva em macrófagos murinos. Além disso, outros estudos devem ser realizados a fim de elucidar os principais mecanismos de morte envolvidos no tratamento *in vitro* de 7OHKA e 7,9OHKA contra *L. amazonensis*, bem como seu efeito nas formas amastigotas intracelulares.

### Agradecimentos

Ao professor Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca (UNIFRAN) por gentilmente ceder o fungo para realização desse trabalho. Ao LABSPEC pela realização dos espectros RMN 1D e 2D.

### Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPQ N° 01/2016 – Universal – Processo 408384/2016-6).

### Declaração de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 5, p. 359–74, maio 1999.
- ABRÃO, F. et al. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, 21 dez. 2015.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, abr. 2011.
- ALVIANO, C. S. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17–23, 1992.
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6299–6303, 2010.
- 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.
- ARAKAWA, N. S. et al. Unusual biotransformation products of the sesquiterpene lactone budlein A by *Aspergillus* species. **Phytochemistry**, v. 96, p. 92–100, 2013.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 1 jan. 2009.
- ATAWODI, S. E. et al. In vitro trypanocidal effect of methanolic extract of some Nigerian savannah plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 9, p. 360–369, 2003.
- AVILA, C. Terpenoids in marine heterobranch molluscs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, 2020.
- BACCARIN, T. et al. Artigo Análise morfoanatómica das partes aéreas de *Wedelia*. v. 19, n. November 2008, p. 612–616, 2009.
- BALAÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1 abr. 1998.

- BALEKAR, N. et al. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1178–1184, 2012a.
- BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 817–824, 14 jun. 2012b.
- BASTOS, D. Z. L. et al. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 834–839, 2007.
- BATISTA, R. et al. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. January, p. 36–40, 2009.
- BATISTA, R. et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 168–176, 2013.
- BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta medica**, v. 65, n. 3, p. 283–284, 1999.
- BERBERT, T. R. N. et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.
- BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 1 abr. 2016.
- BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85–89, 1998.
- BLUM, M. S.; BRAND, J. A. **Social Insect Pheromones: Their Chemistry and Function**. **AM. ZOOLOGIST**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article/12/3/553/1997754>>. Acesso em: 11 jun. 2021.
- BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: The biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 345–347, 2004.
- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in trypanosomacruzi. **Molecules**, v. 23, n. 11, 28 out. 2018.
- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived

- naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 408–418, 1 jan. 2019.
- BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi. **Quimica Nova**, v. 34, n. 8, p. 1354–1357, 2011.
- BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology research**, p. 1–11, 2016.
- BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11–20, 2018.
- BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153536, 1 maio 2021.
- BRAHMACHARI, G. Bioactive natural products: Opportunities and challenges in medicinal chemistry. **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**, p. 1–670, 1 jan. 2011.
- BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. [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.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CADENA-GONZÁLEZ, A. L.; SØRENSEN, M.; THEILADE, I. Use and valuation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquirá, Boyacá, Colombia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 23, 11 abr. 2013.
- CALDWELL, G. et al. ADME Optimization and Toxicity Assessment in Early- and Late-Phase Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 965–980, 17 out. 2009.
- CAMPOS, M. C. O. et al. Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: Activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1193–1204, 2010.
- CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology**

**Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 1 jan. 2015.

CARBON-MANGELS, M.; HUTTER, M. C. Selecting relevant descriptors for classification by Bayesian estimates: A comparison with decision trees and support vector machines approaches for disparate data sets. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 10, p. 885–895, 1 out. 2011.

CARIDHA, D. et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 106–117, 1 dez. 2019.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.

CHEN, Y. et al. Biotransformation of cyperenoic acid by *Cunninghamella elegans* AS 3.2028 and the potent anti-angiogenic activities of its metabolites. **Fitoterapia**, v. 118, p. 32–37, 1 abr. 2017.

CHENG, F. et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and noninhibitors using combined classifiers. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 5, p. 996–1011, 23 maio 2011a.

CHENG, F. et al. Insights into molecular basis of cytochrome P450 inhibitory promiscuity of compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2482–2495, 24 out. 2011b.

CHENG, F. et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 26 nov. 2012.

CHOUDHARY, M. I. et al. Microbial transformation of sesquiterpenes, (-)-Ambrox® and (+)-sclareolide. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 10, p. 2685–2694, 2004.

CONCATO, V. M. et al. 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol induces cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109133, 24 maio 2020.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on chagas disease chemotherapy** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* Fundacao Oswaldo Cruz, , 2002.

- CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, 2005.
- CZUB, J.; BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes-A molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2616–2626, 1 out. 2007.
- DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanocidal activity. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 557–559, 1996.
- DA COSTA, R. M. et al. In vitro cytotoxicity and structure-activity relationship approaches of ent-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. **Phytochemistry**, v. 156, p. 214–223, 1 dez. 2018.
- DA SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.
- DA SILVA FERREIRA, D. et al. Natural products and Chagas' disease: The action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, p. 243–256, 2013.
- DAI, J. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. **EXCLI journal**, v. 12, p. 479–90, 2013.
- DE CARVALHO, G. J. A. . et al. DITERPENOS, TRITERPENOS E ESTERÓIDES DAS FLORES DE *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 24–26, 2001.
- DE OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Dolioscarpus schottianus* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 95–98, 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. Third Edit ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- DO NASCIMENTO, J. S.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; DE OLIVEIRA SILVA, E. Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 568–577, 23 ago. 2018.
- DOLAI, S.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 197, n. 1–2, p. 1–8, out. 2014.
- DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–

146, 2014.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil.

**Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.

DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 259–267, 1 abr. 2017.

FAN, Y. J.; ZONG, W. X. The cellular decision between apoptosis and autophagy.

**Chinese Journal of Cancer**, v. 32, n. 3, p. 121–129, 2013.

FELCZAK, A. et al. Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition.

**Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8872–8880, 1 maio 2016.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro de Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4, p. 395–439, 2009.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology** 2017 15:4, v. 15, n. 4, p. 217–231, 1 abr. 2017.

FRAGA, B. M. et al. Microbial transformation of two 15 $\alpha$ -hydroxy-ent-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 66, n. 1, p. 227–234, 2 jan. 2010.

FRAGA, B. M. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 $\beta$ -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*).

**Phytochemistry**, v. 81, p. 60–70, set. 2012.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101565, 29 jan. 2020.

FREITAS, T. P. et al. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol Res**, v. 157, n. 3, p. 201–206, 2002.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: **International Association for Plant Taxonomy**. [s.l.] International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 167–170, 2002.

- GARCÍA, P. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 455–483, 13 mar. 2007.
- GERVAZONI, L. F. O. et al. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 0, p. 1031, 23 nov. 2020.
- 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.
- GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, n. May, p. 224–232, 2018.
- GONZÁLEZ, M. A. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. **Natural product reports**, v. 32, n. 5, p. 684–704, 1 maio 2015.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma Cruzi*. In: **American Trypanosomiasis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. p. 321–338.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 1 ago. 2002.
- HANSEN, K. et al. Benchmark data set for in silico prediction of Ames mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 9, p. 2077–2081, 28 set. 2009.
- HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 1, p. 88–94, fev. 2001.
- HANSON, J. R. Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1654–1663, 1 dez. 2015.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2831–2846, nov. 2007.
- HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kaurane and kaurene diterpenes from the stem bark of *Xylopia acutiflora*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2134–2135, jan. 1982.
- HISSA, B. et al. Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates *Trypanosoma cruzi* Invasion of Host Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1583, mar. 2012.
- HOPKINS, A. L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery.

**Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682–690, 20 out. 2008.

HUTCHISON, M.; LEWER, P.; MACMILLAN, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of eighteen derivatives of ent-kaur-16-en-19-oic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2363–2366, 1984.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. e69–e75, 15 nov. 2010.

JAÉN-GIL, A. et al. Fungal treatment of metoprolol and its recalcitrant metabolite metoprolol acid in hospital wastewater: Biotransformation, sorption and ecotoxicological impact. **Water Research**, v. 152, p. 171–180, 2019.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 502, 6 dez. 2018.

JIN, Y. et al. Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in hepg2 cells by increasing perilipin 2 expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.

KATOCH, M.; SALGOTRA, A.; SINGH, G. Endophytic fungi found in association with Bacopa monnieri as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 714–722, 2014.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.

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.

KEUM, Y. S.; LEE, Y. H.; JEONG-HAN, K. Metabolism of methoxychlor by cunninghamella elegans ATCC36112. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7931–7937, 9 set. 2009.

KIAN, D. et al. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. November 2017, p. 1294–1301, 2018.

KUNDU, S.; DEY, A.; BANDYOPADHYAY, A. Stimulation of in vitro morphogenesis, antioxidant activity and over expression of kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in Stevia rebaudiana Bertoni by chlorocholine chloride. **Acta Physiologiae Plantarum**,

v. 36, n. 10, p. 2683–2693, 1 set. 2014.

LAGUNIN, A. et al. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 806–810, 1 ago. 2009.

LAKE, B. G.; PRICE, R. J. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. **Xenobiotica**, v. 43, n. 1, p. 41–53, jan. 2013.

LAMBERT, J. B.; VAGENAS, A. R. Dependence of the  $\gamma$  carbon-13 shielding effect on the dihedral angle. **Organic Magnetic Resonance**, v. 17, n. 4, p. 265–269, 1 dez. 1981.

LANG, K. et al. Biomonitored UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>2</sup> and HPLC-UV thermostability study of the aerial parts of *Sphagneticola trilobata* ( L . ) Pruski , Asteraceae. **Talanta**, v. 167, n. February, p. 302–309, 2017.

LECH, J. J.; BEND, J. R. Relationship between biotransformation and the toxicity and fate of xenobiotic chemicals in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. VOL.34, p. 115–131, fev. 1980.

LEE, S.-J. et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Formation of Lipid Droplets as a Generalized Response to Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

LI, X. et al. Structures and Biological Properties of the Chemical Constituents from the Genus *Wedelia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 5, p. 823–836, 1 maio 2007.

LIMA, E. C. et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 457–65, fev. 1997.

LIMA, M. A. S. et al. *Aspergillus Niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2029–2059, 2019.

LIN, L. G. et al. Naturally occurring diterpenoid dimers: Source, biosynthesis, chemistry and bioactivities. **Planta Medica**, v. 82, n. 15, p. 1309–1328, 1 ago. 2016.

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.

LIRA, R. et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: Potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **Journal of Antimicrobial**

**Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 537–546, 1 maio 2001.

LOWE, H. et al. molecules Antiviral Activity of Jamaican Medicinal Plants and Isolated Bioactiv Compounds. 2021.

MA, B. et al. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 7, p. 1067–1074, 2007.

MA, B. J. et al. ent-Kaurane diterpenoids from the plant *Wedelia trilobata*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 3, p. 107–111, 1 jun. 2013.

MACHADO, P. DE A. et al. VOSalophen: a vanadium complex with a stilbene derivative—induction of apoptosis, autophagy, and efficiency in experimental cutaneous leishmaniasis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 929–939, 2017.

MACIEL et al. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, 2006.

MACRI, J. A. et al. Immunomodulatory and Antioxidant properties of Kaurenoic acid on macrophages of BALB/c in Vitro. **American Journal of Immunology**, v. 10, n. 4, p. 183–188, 2014.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 122, p. 430–433, 2009a.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 430–433, 21 abr. 2009b.

MANDEL, J. R. et al. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 28, p. 14083–14088, 2019.

MARCHESE ROBINSON, R. L.; GLEN, R. C.; MITCHELL, J. B. O. Development and comparison of hERG blocker classifiers: Assessment on different datasets yields markedly different results. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 5, p. 443–458, 16 maio 2011.

MARCONDES-ALVES, L. et al. Kaurenoic acid extracted from *Sphagneticola trilobata* reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through inhibition of

oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in mice. **Natural Product Research**, v. 6419, n. December, p. 1–4, 2017.

MARINI, V. et al. Vaccination with trypanosoma rangeli modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of Trypanosoma cruzi experimental infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 32–37, 2011.

MARQUINA, S. et al. Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17–18, p. 2017–2022, 1 dez. 2009.

MARTINS, C. H. G. et al. Kaurenoic acid and its sodium salt derivative: Antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and their mechanism of action. **Future Microbiology**, v. 13, n. 14, p. 1585–1601, 1 nov. 2018.

MENEZES, C. et al. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 471–479, set. 2011.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, fev. 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 1 fev. 2019.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed research international**, v. 2014, p. 614014, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. **Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis**, 16 dez. 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 286, 8 ago. 2012.

MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 392918, 2015.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO – Cyclic GMP – Protein Kinase G – ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway.

**Journal of Natural Products**, n. 75, p. 896–904, 2012.

MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 1 out. 2015.

MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55–66, 2010.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

NAKAMURA, C. V. et al. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

NASCIMENTO, J. S. DO et al. Mapping the Biotransformation of Coumarins through Filamentous Fungi. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 19, 29 set. 2019.

NATH, A. et al. Quantifying and predicting the promiscuity and isoform specificity of small-molecule cytochrome P450 inhibitors. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 12, p. 2195–2203, dez. 2010.

NDOM, J. C. et al. New alkamide and ent-kaurane diterpenoid derivatives from *Senecio erectitoides* (Asteraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 4, p. 201–206, 17 dez. 2010.

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, dez. .

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, 1 dez. 2017.

NOGUEIRA, M. S. et al. ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. **Molecules**, v. 21, n. 9, set. 2016a.

NOGUEIRA, M. S. et al. ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1–14,

set. 2016b.

NURBY, R. et al. In vivo anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*. **Revista Facultad de Farmacia**, 2017.

OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial Effects of a Lipophilic Fraction and Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark Extracts of *Annona senegalensis*. v. 2012, 2012.

OKOYE, T. C. et al. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38–43, 2013.

OLIVEIRA, L. C. et al. Schistosomicidal activity of kaurane, labdane and clerodane-type diterpenes obtained by fungal transformation. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 34–40, 1 nov. 2020.

OPAS. **OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ORTIZ, J. V. et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil.

**Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, n. 3, p. 240–246, 1 mar. 2019.

PAGLIARA, V. et al. Bioactive ent-kaurane diterpenes oridonin and irudonin prevent cancer cells migration by interacting with the actin cytoskeleton controller ezrin.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–19, out. 2020.

PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2018.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 1 dez. 2002.

PANDA, S. K.; LUYTEN, W. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. **Parasite**, v. 25, p. 10, 2018.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. . nov. 2012, p. 1959–1972.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1731–1740, dez. 2012.

- PASSERO, L. F. D. et al. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1275–1286, 2 out. 2018.
- PEARCE, C. M.; LUSHNIKOVA, M. V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3–4, p. 87–91, 4 ago. 2006.
- PECHWANG, J. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Psilocybe cubensis*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 10, p. 905–914, jun. 2010.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: Epidemiology, clinical presentation and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, jun. 2012.
- PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review). **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya**, v. 49, n. 5, p. 435–49, 2013.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1–5, jan. 2012.
- PFEIFER BARBOSA, A. L. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, abr. 2019.
- PHAM THE, H. et al. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 4, p. 376–385, 18 abr. 2011.
- PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, nov. 2010.
- PISKA, K. et al. *Cunninghamella* Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 107–117, 21 jan. 2016.
- POTHULURI, J. V et al. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3654–9, 1 nov.

1992.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. AUG, 6 ago. 2015.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2014.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 1 mar. 2013.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

RIBEIRO NETO, J. A. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112547, jan. 2020.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7–17, 2020.

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

ROGGERO, E. et al. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 123–131, jun. 2004.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. 2008.

RUAN, Y. et al. Specific 12 $\alpha$ -hydroxylation of grandiflorenic acid by permeabilised fungus *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 9, p. 677–679, 3 maio 2014.

SALES, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625–634, 1985.

SANTOS, R. I. DOS. Metabolitos básicos e origem dos metabolitos secundários. In:

UFSC (Ed.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6° ed. ed.

Florianópolis: [s.n.]. p. 403–434.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567–569, 1 ago. 2003.

SAÚDE;, M. DA. **Boletim epidemiológico - Doença de Chagas**. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em: 30 jul. 2021.

SCHWIRKOWSKI, P. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: Sphagneticola trilobata**. Disponível em:

<[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=7280](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7280)>. Acesso em: 8 jun. 2021.

SESSA, D. P. et al. 15 $\beta$ -Senecioid-ent-kaur-16-en-19-oic Acid, a Diterpene Isolated from *Baccharis lateralis*, as Promising Oral Compound for the Treatment of Schistosomiasis. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 12, p. 3744–3750, dez. 2020.

SHEN, J. et al. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 6, p. 1034–1041, 28 jun. 2010.

SIBBR. **Sphagneticola trilobata (L) Pruski**. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/285825#classification>>. Acesso em: 25 ago. 2021.

SILVA, E. A. et al. The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 397–400, 1 out. 1999.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *brasiliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–31, ago. 2009.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 17 nov. 2010.

SMITHA, M. S.; SINGH, S. .; SINGH, R. Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 4, n. 2, 2017.

SOUSA, I. et al. Biotransformation of diterpenes from *Copaifera* sp. oleoresins using

- filamentous fungi. **Planta Medica**, v. 4, n. S 01, p. Tu-SL-03, 24 out. 2017.
- SOUSA, R. DOS S. et al. POTENCIAL DA ESPÉCIE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, p. 720–730, 2018.
- SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.
- STROPPA, P. H. F.; ANTINARELLI, L. M. R.; CARLO, A. M. L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. . Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3034–3045, 2017.
- SULTAN, S. et al. Fungal transformation of cedryl acetate and  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay, quantum mechanical calculations and molecular docking studies of its metabolites. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 764–770, 1 abr. 2013.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, p. 1–16, 2015.
- TAKAHASHI, J. A. et al. molecules The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. **Molecules**, v. 19, p. 1856–1886, 2014.
- TAVEEPANICH, S. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Absidia blakesleeana* and *Rhizopus oligosporus*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 11, p. 1050–1058, 2010.
- TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 10 out. 2013.
- TEIXEIRA, T. L. et al. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. **Pathogens and Global Health**, v. 108, p. 30–36, 2014.
- TIRINATO, L. et al. ROS and Lipid Droplet accumulation induced by high glucose exposure in healthy colon and Colorectal Cancer Stem Cells. **Genes and Diseases**, 25 set. 2019.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf ex. **Biomedicine and**

- Pharmacotherapy**, v. 98, n. September 2017, p. 662–672, 2018a.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 31 out. 2018b.
- TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 6 jan. 2012.
- UENO, A. K. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, n. October 2017, p. 55–58, 2018.
- 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.
- VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). **Chemical reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579–612, 10 set. 2014.
- VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.
- VENISETTY, R.; CIDDI, V. Application of Microbial Biotransformation for the New Drug Discovery Using Natural Drugs as Substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153–167, 25 mar. 2005.
- VILLA-RUANO, N.; LOZOYA-GLORIA, E.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y. Kaurenoic Acid: A Diterpene With a Wide Range of Biological Activities. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 51p. 151–174.
- VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161–1174, 2019.
- WANG, J. et al. Development of reliable aqueous solubility models and their application in druglike analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1395–1404, jul. 2007.
- WANG, R.-F. et al. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 55–61, 1 jul. 2000.
- WATANABE, S.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; FU, S. Structural Elucidation of Metabolites of Synthetic Cannabinoid UR-144 by *Cunninghamella elegans* Using

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **AAPS Journal**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 1 mar. 2018.

WEITZMAN, I.; CRIST, M. Y. Studies with Clinical Isolates of *Cunninghamella* II. Physiological and Morphological Studies. **Mycologia**, v. 72, n. 4, p. 661–669, jul. 1980.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty** 2018 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–9, 18 jun. 2018.

WHO. **Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

WHO. **Neglected tropical diseases: enhancing safe treatment for more than 1 billion people annually**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/16-08-2021-neglected-tropical-diseases-enhancing-safe-treatment-for-more-than-1-billion-people-annually>>. Acesso em: 25 ago. 2021a.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 30 jul. 2021b.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 27 jul. 2021c.

WHO | Prevention of Chagas disease. **WHO**, 2016.

WILLIAMS, A. J. et al. Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Chemosphere**, v. 67, n. 2, p. 240–243, 1 fev. 2007.

WILLIAMS, T. et al. Induction of Effective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 88, n. 4, 23 mar. 2020.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 1 set. 2003.

XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and biotransformation of pentachlorophenol by wood-decaying white rot fungus *Phlebia acanthocystis* TMIC34875. **Journal of Wood Science**, v. 66, n. 1, 2020.

XIN, X. L. et al. Microbial transformation of acetyl-11-keto-boswellic acid by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 11, p. 1173–1178, 1 nov. 2013.

XING, H. et al. Anti-Inflammatory ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon serra*.

**Journal of Natural Products**, v. 83, n. 10, p. 2844–2853, out. 2020.

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

ZANK, S. et al. Local health practices and the knowledge of medicinal plants in a Brazilian semi-arid region: Environmental benefits to human health. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 11, n. 1, p. 11, 23 fev. 2015.

ZAWADZKA, K. et al. Carbazole hydroxylation by the filamentous fungi of the *Cunninghamella* species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19658–19666, 1 dez. 2015.

ZHANG, Z. H.; HU, B. Q.; HU, G. Assessment of allelopathic potential of *Wedelia trilobata* on the germination, seedling growth and chlorophyll content of rape. **Advanced Materials Research**, v. 807–809, p. 719–722, 2013.

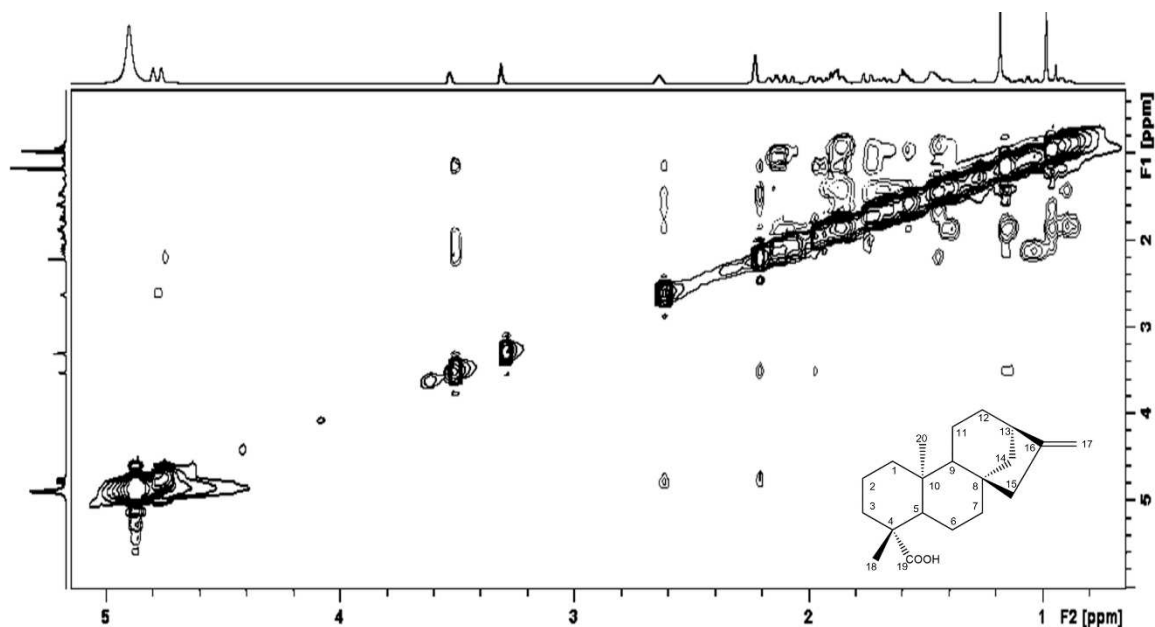
ZHU, Y. et al. Metabolic characterization of pyrotinib in humans by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1033–1034, p. 117–127, 15 out. 2016.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.

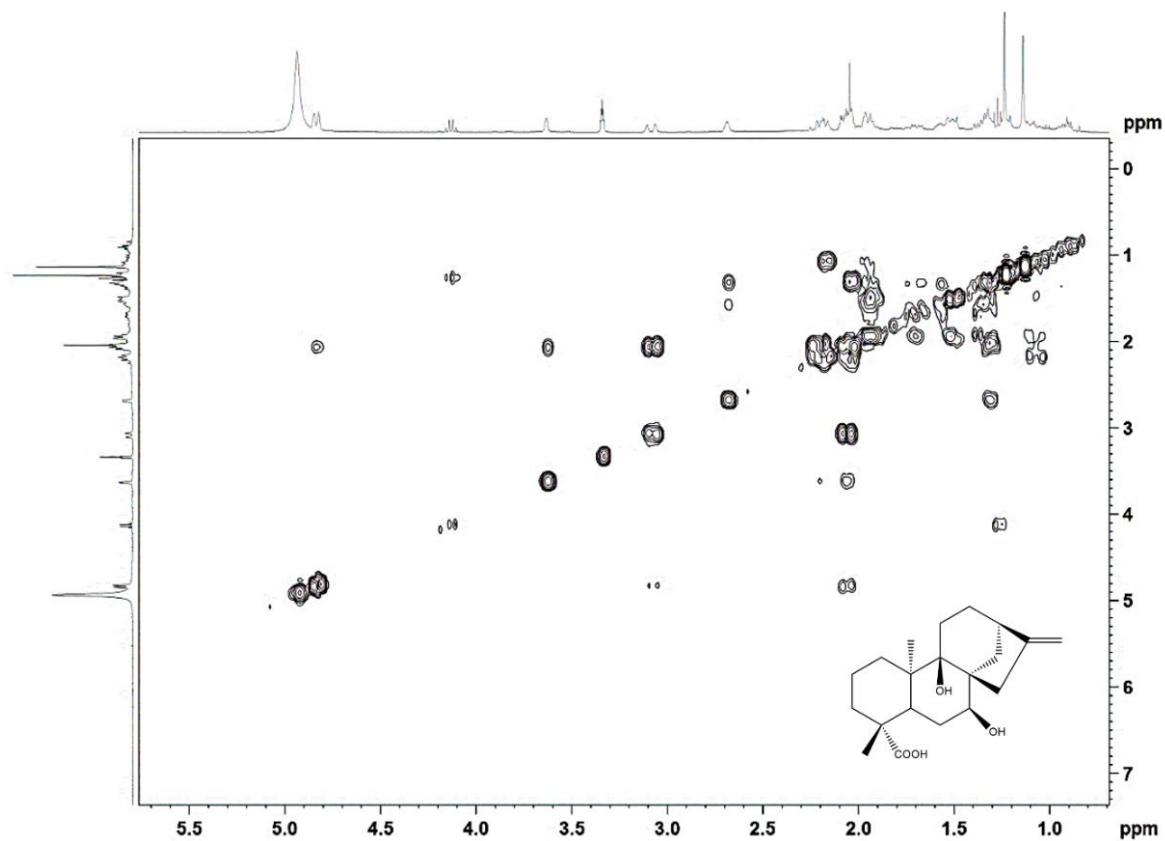
## APÊNDICE I

**Figura A1:** Ampliação do espectro 2D NOESY do 7OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



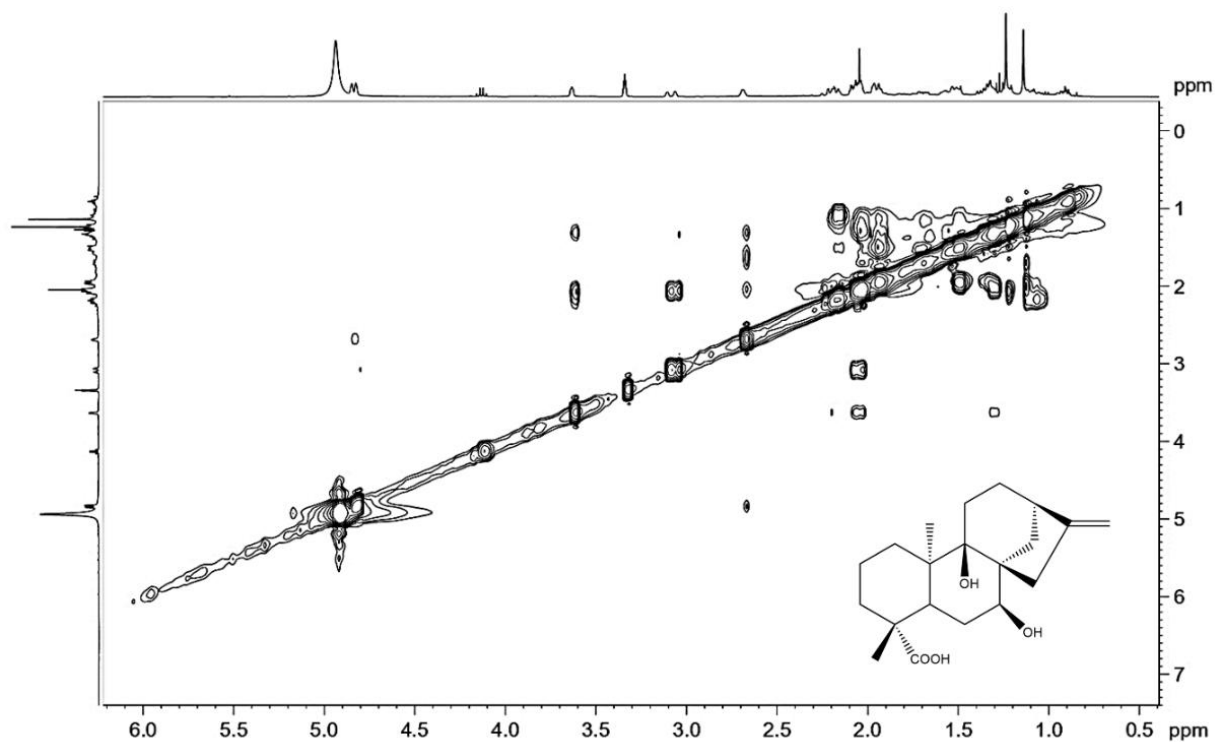
## APÊNDICE II

**Figura A2:** Ampliação do espectro 2D COSY demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



## APÊNDICE III

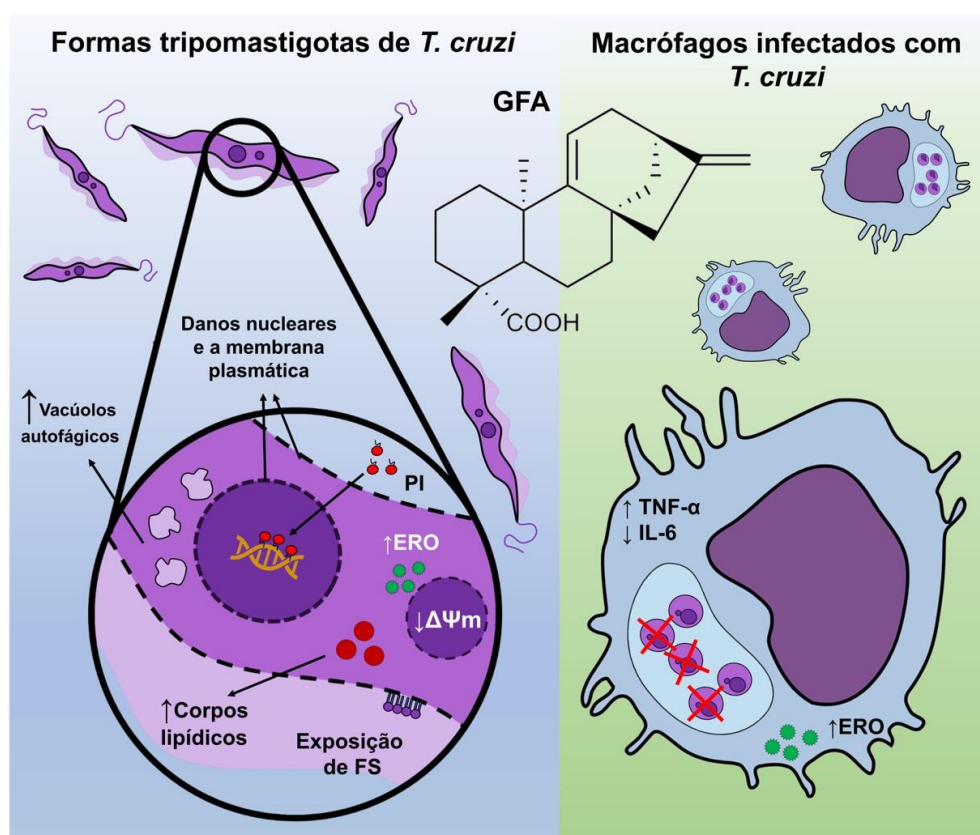
**Figura A3:** Ampliação do espectro 2D NOESY demonstrando os principais acoplamentos do 7,9OHKA obtido pela biotransformação do KA isolado da *S. trilobata* em CD<sub>3</sub>OD.



## CAPÍTULO III

(Artigo submetido na revista Toxicology in vitro)

**ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO ISOLADO DE *SPHAGNETICOLA TRILOBATA*  
CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*: TOXICIDADE, MECANISMOS DE AÇÃO E  
IMUNOMODULAÇÃO.**



**Figura 1:** Resumo gráfico

**Legenda:** Nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, GFA foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzir a despolarização mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), aumentar a formação de corpos lipídicos e vacúolos autofágicos. Além disso foi capaz de causar danos nucleares e na membrana plasmática, observados através da exposição de fosfatidilserina (FS) e pela marcação de iodeto de propídio (PI). Nos macrófagos infectados com *T. cruzi*, GFA induziu aumento de ERO, TNF- $\alpha$  e redução de IL-6, levando a morte parasitária.

## Resumo

O ácido grandiflorênico (GFA) é um dos principais diterpenos caurano encontrados em diferentes partes de *Sphagneticola trilobata*. Possui diversas atividades biológicas, destacando-se a ação antiprotozoária. A doença de Chagas é uma doença sistêmica complexa causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, em que os medicamentos disponíveis apresentam efeitos adversos significativos. Assim, a busca por alternativas terapêuticas é necessária e urgente. Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito do GFA sobre formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Os resultados mostraram que o tratamento com GFA reduziu significativamente a viabilidade das formas tripomastigotas, com alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitos tratados com IC<sub>50</sub> (24,60 nM) de GFA, bem como aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), despolarização mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos, presença de vacúolos autofágicos, exposição de fosfatidilserina e danos à membrana plasmática. Além disso, o tratamento com GFA reduziu o percentual de células infectadas e o número de formas amastigotas por macrófago (J774A.1), sem apresentar citotoxicidade nas células J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, THP-1 e AMJ2-C11. GFA aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  e reduziu os níveis de IL-6 em macrófagos infectados. Em conclusão, o tratamento com GFA atuou nas formas tripomastigotas por meio de mecanismo semelhante a apoptose e eliminação dos parasitos intracelulares pela via do TNF- $\alpha$  / ERO, sem apresentar citotoxicidade celular.

**Palavras-chave:** Diterpeno Caurano; *Wedelia paludosa*; Atividade tripanocida; Morte celular.

## Abstract

Grandiflorenic acid (GFA) is one of the main kaurane diterpenes found in different parts of *Sphagneticola trilobata*. It has several biological activities, especially antiprotozoal action. Chagas disease is a complex systemic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, in which the drugs available have significant side effects. Thus, the search for therapeutic alternatives is necessary and urgent. This work aimed to determine the effect of GFA on trypomastigote and intracellular amastigote forms. Our results showed that GFA treatment significantly reduced the viability of trypomastigote forms, with morphological and ultrastructural changes in the parasites treated with IC<sub>50</sub> of GFA (24.60 nM), as well as an increase in the reactive oxygen species (ROS) levels, mitochondrial depolarization, lipid droplets accumulation, presence of autophagic vacuoles, phosphatidylserine exposure, and plasma membrane damage. In addition, GFA treatment caused a reduction in the percentage of infected cells and the number of amastigotes per macrophage (J774A.1), without showing cytotoxicity in J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, THP-1, and AMJ2-C11. GFA increased TNF- $\alpha$  and reduced IL-6 levels in infected macrophages. In conclusion, GFA treatment acted in trypomastigote forms through a mechanism like apoptosis and the elimination of intracellular parasites through the TNF- $\alpha$ /ROS pathway, without presenting cellular cytotoxicity.

**Keywords:** Kaurane diterpene; *Wedelia paludosa*; Tripanocidal activity; cell death.

## 1 INTRODUÇÃO

*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (Asteraceae) é uma planta herbácea, nativa de regiões tropicais e, no Brasil, pode ser encontrada em todos os Estados. Seu uso popular está relacionado a processos inflamatórios em geral, incluindo dores nas articulações, doenças reumáticas, artrites, além de tratar feridas persistentes, úlceras e edemas (MALDINI et al., 2009a).

Estudos fitoquímicos mostraram extratos de *S. trilobata* apresenta em sua composição principalmente compostos esteroidais, flavonoides e compostos terpênicos (BLOCK et al., 1998; DE CARVALHO et al., 2001). Em relação aos compostos terpênicos, o ácido caurenóico (do inglês *ent-kaur-16-en-19-oic acid*, KA) e o ácido grandiflorênico (do inglês *ent-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid*, GFA) são os principais diterpenos cauranos presentes na *S. trilobata*, encontrados em diferentes partes da planta, como folhas, caules e raízes (BORTOLETI et al., 2018; MARCONDES-ALVES et al., 2017). GFA possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis* (BALEKAR et al., 2012a), atividade anti-inflamatória *in vivo* em camundongos (NURBY; et al., 2017) e especialmente ação antiprotozoária contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* (BORTOLETI et al., 2018), e formas tripomastigotas de *Trypanosoma. cruzi* (BATISTA; CHIARI; DE OLIVEIRA, 1999).

Com relação ao protozoário *T. cruzi*, este é agente etiológico da doença de chagas (tripanossomíase americana), a qual é considerada pela Organização Mundial da Saúde como doença tropical negligenciada, sendo uma parasitose crônica transmitida principalmente por insetos hemípteros triatomíneos, e que apresenta dificuldades e limitações no seu diagnóstico e tratamento etiológico (WHO, 2021b). 30–40% dos indivíduos afetados desenvolvem uma infecção crônica sintomática, sendo a cardiomiopatia a condição mais prevalente (HISSA et al., 2012).

Apesar da doença ser endêmica nas Américas, atualmente atinge milhões de pessoas em todo o mundo devido a migração de populações infectadas ultrapassando a marca de 6 milhões de pacientes com a doença (WHO, 2021b).

Embora a doença de Chagas seja descrita há mais de um século, a quimioterapia ainda se limita a medicamentos nitro-heterocíclicos, o benznidazol e nifurtimox, apesar de sua eficácia na fase aguda da infecção (entre 60-80 %), apresentam efeitos adversos significativos para os pacientes, destacando-se, por

exemplo, toxicidade do sistema nervoso central e leucopenia, o que limita sua utilidade e leva à descontinuação do tratamento (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005). Além disso, foi demonstrado que esses medicamentos, embora eficazes contra a forma sanguínea do parasito, não são capazes de reduzir significativamente os danos aos tecidos encontrados no estágio crônico (MORILLO et al., 2015).

De acordo com as restrições apresentadas pelos medicamentos convencionais, faz-se necessário a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como alternativa no tratamento desta doença. Portanto, no presente estudo, investigamos a atividade tripanocida do GFA isolado das raízes de *Sphagneticola trilobata* e os mecanismos de morte envolvidos na eliminação do *T. cruzi*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

As raízes secas ao ar de *Sphagneticola trilobata* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais (23° 32'64" N/51° 20'63" W) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL) (n°. 49306), coletado por um dos autores (N.S.A.). A amostra foi identificada pela Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Odete Santos Vieira, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal (Centro de Ciências Biológicas, UEL).

### 2.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO (GFA)

Após o processo de coleta e limpeza, a secagem das raízes ocorreu em três dias à temperatura ambiente. Em seguida, este material foi pulverizado seguido de extração exaustiva com diclorometano (900 mL) e secagem em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato bruto obtido foi ressuspenso em 300 mL de metanol: água (9:1) e filtrado. A fração solúvel foi particionada em n-hexano, e as subfrações obtidas também foram secas por pressão reduzida. A fração hexânica foi submetida a cromatografia líquida a vácuo utilizando sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) como fase estacionária e como fase móvel hexano: acetato de etila: metanol em gradiente crescente de polaridade. A segunda fração apresentou a formação de um composto amorfo (200 mg), que foi submetido à lavagem com metanol em baixa temperatura (4° C). A identificação do composto foi realizada por ressonância magnética nuclear (NMR) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Bruker Avance Model III, 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C) utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente e os resultados foram comparados com dados da literatura (DA COSTA; ALBUQUERQUE; VICHNEWSKI, 1996). O ponto de fusão (p.f.) foi determinado em um aparelho de placa quente (MQAPF 302 Microchemistry). Os dados de identificação do composto foram apresentados em nosso estudo anterior e o mesmo GFA foi usado e relatado anteriormente (BORTOLETI et al., 2018).

## 2.3 ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*.

### 2.3.1 Parasitos *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y de *T. cruzi*, da linhagem *T. cruzi* (ZINGALES et al., 2009), foi mantida por inoculação intraperitoneal semanal de formas tripomastigotas sanguíneas em camundongos BALB/c (Comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual de Londrina nº 21717.2018.36). Quando necessário para análise, o sangue rico em parasitos foi coletado desses camundongos BALB/c, inoculados e transferidos para uma cultura de células epiteliais de rim de macaco rhesus [*Macaca mulatta*] (células LLCMK<sub>2</sub>, ATCC® CCL-7™), cultivadas em meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 5 % de soro bovino fetal (SBF; Life Technologies) a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5 % de CO<sub>2</sub>. As culturas celulares foram infectadas com as formas tripomastigotas (5×10<sup>6</sup>) e após 24 h os parasitos não internalizados foram removidos e as culturas mantidas em meio DMEM com 5 % de SBF a 37 °C em uma atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Sete dias pós-infecção, resultou na coleta de formas tripomastigotas dos sobrenadantes celulares.

### 2.3.2 Atividade Anti-Tripomastigotas

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas dos sobrenadantes de células LLCMK<sub>2</sub> foram plaqueadas a 10<sup>6</sup> parasitos/mL em placas de 24 poços e foram tratadas com diferentes concentrações de GFA (3,12; 6,25; 12,50; 25; 50; 75 e 100 nM) (BORTOLETI et al., 2018), mantidas em D.B.O a 25 °C. Após 24 h de tratamento, os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* mantidos em meio de cultura DMEM sem tratamento ou com DMSO 0,01 % (veículo) foram utilizados como controle negativo. A concentração capaz de eliminar 50 % (IC<sub>50</sub>) dos parasitos foi calculada por regressão não linear para a curva de dose-resposta usando o *software* Graph Pad Prism 6.01.

### 2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV das formas tripomastigotas foi realizada de acordo com a literatura (GONÇALVES et al., 2018). Resumidamente, os parasitos ( $10^6$  parasito/mL) foram tratados com  $IC_{50}$  (24,6 nM) e  $2x IC_{50}$  (49,2 nM) de GFA e DMSO 0,01 % por 24 h. Após este procedimento, foram coletados e submetidos à fixação com glutaraldeído 2,5 % em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo  $CaCl_2$  à 1 mM, em seguida foram colocados em lamínulas de poli-L-lisina previamente tratadas e desidratadas em concentrações crescentes de etanol, ponto seco de  $CO_2$ , ouro-revestido e analisadas em microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTA 200. O comprimento das formas tripomastigotas foi analisado no *software* Image-Pro Plus, a partir das imagens obtidas pelo aumento de 10.000 x. Pelo menos três imagens de cada condição foram submetidas à medição.

### 2.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliação das alterações ultraestruturais por MET, formas tripomastigotas ( $10^6$  parasito/mL) foram tratados com  $IC_{50}$  (24,6 nM) e  $2x IC_{50}$  (49,2 nM) de GFA e DMSO 0,01 % por 24 h. Após esse procedimento, os parasitos foram coletados por centrifugação, lavados com PBS 0,01 M (pH 7,2) e fixados por imersão em glutaraldeído (2,5 %) e em tampão cacodilato de sódio (0,1 M). Os parasitos foram pós-fixados em uma solução de tetróxido de ósmio (1 %), ferrocianeto de potássio (0,8 %) e  $CaCl_2$  (10,0 mM) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) a temperatura ambiente, protegidos da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,1 M), desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50 – 100 %), incluídas em resina EPON e polimerizadas a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram confeccionados em um ultramicrotomo, depositados em grade de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, por 20 e 10 min, respectivamente. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400.

### 2.3.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em Formas Tripomastigotas

A produção de ERO foi avaliada pela conversão de H<sub>2</sub>DCFDA não fluorescente em altamente fluorescente 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (10<sup>6</sup> parasito/mL) tratadas com IC<sub>50</sub> (24,6 nM) e 2x IC<sub>50</sub> (49,2 nM) de GFA por 24 h conforme descrito na literatura (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018a). Foram usados parasitos não tratados como controle negativo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como controle positivo. As ERO produzidas foram analisadas fluorimetricamente em um comprimento de onda de 488 nm (excitação) e de 530 nm (emissão) em um leitor de microplaca de fluorescência (Perkin-Elmer, Victor X3, MA, EUA).

### 2.3.6 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Formas tripomastigotas (10<sup>6</sup> células/mL) foram tratadas com IC<sub>50</sub> (24,6 nM) e 2x IC<sub>50</sub> (49,2 nM) durante 24 horas a 25 °C. Em seguida, os parasitos foram lavados com PBS e incubados com 25 nM de éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 min a 25 °C. A fluorescência foi medida em um espectrofluorômetro Victor X3 (PerkinElmer, Victor X3, MA, EUA) em um comprimento de onda de excitação de 480 nm e um comprimento de onda de emissão de 580 nm. Para comparar os diferentes tratamentos, os valores fluorescentes obtidos foram normalizados para o respectivo número de células. Carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) foi usado como um controle positivo

### 2.3.7 Detecção de Acúmulo de Corpos Lipídios

Formas tripomastigotas (10<sup>6</sup> parasito/mL) foram tratadas com GFA IC<sub>50</sub> (24,6 nM) e 2x IC<sub>50</sub> (49,2 nM) por 24 h. Em seguida, os parasitos foram marcados com 10 µg/mL de vermelho do nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos (STROPPIA et al., 2017), a fluorescência foi determinada em um comprimento de onda de 530 nm (excitação) e de 635 nm (emissão), em um leitor de microplaca de fluorescência (Perkin-Elmer, Victor X3, MA, EUA). PBS foi utilizado como controle positivo.

### 2.3.8 Quantificação de Vacúolos Autofágicos

A verificação da formação de vacúolos autofágicos nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizada de acordo com Machado et al., (2017) com modificações. Resumidamente, as formas tripomastigotas ( $10^6$  parasito/mL) foram tratadas com GFA  $IC_{50}$  (24,6 nM) e  $2x IC_{50}$  (49,2 nM) por 24 h a 25 °C, em seguida foram marcadas com 50  $\mu$ M de monodansilcadaverina (MDC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h (mantidas no escuro) a 24 °C. Após a lavagem com PBS, os parasitos foram centrifugados a 3.000 RPM por 5 min e plaqueados em uma placa de 96 poços. A fluorescência foi medida em um espectrofluorômetro Victor X3 (PerkinElmer, Victor X3, MA, EUA) nos comprimentos de onda de 380 e 525 nm para excitação e emissão respectivamente. PBS foi usado como controle positivo.

### 2.3.9 Determinação da Exposição à Fosfatidilserina

A exposição à fosfatidilserina foi detectada usando Anexina-V FITC (Invitrogen, New York, EUA), uma proteína de ligação a fosfolipídios usada como marcador de apoptose. Formas tripomastigotas ( $10^6$  células / mL) foram tratados com GFA- $IC_{50}$  (24,60 nM) e  $2x$  o  $IC_{50}$  (49,20 nM) durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, os parasitos foram lavados e ressuspensos em um tampão de ligação de 100  $\mu$ L (NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  5 mM e HEPES-Na 10 mM, pH 7,4) seguido pela adição de 5  $\mu$ L de anexina-V FITC por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o tampão de incubação (400  $\mu$ L). A aquisição de dados foi realizada usando um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia) em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 520 nm. Para comparação dos diferentes tratamentos, os valores de fluorescência obtidos foram normalizados para o respectivo número de células.

### 2.3.10 Determinação da Integridade da Membrana Celular

Formas tripomastigotas ( $10^6$  células/mL) submetidos a um tratamento de 24 h com GFA- $IC_{50}$  (24,60 nM) e  $2x$  o  $IC_{50}$  (49,20 nM) a 37 °C foram colhidos, lavados com PBS e seguidos diretamente para uma incubação de 5 min com iodeto de propídio (PI) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (0,50  $\mu$ g/mL) de acordo com (BORTOLETI et al.,

2018). Imediatamente depois, os parasitos foram analisados usando um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia) com um comprimento de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 580 nm. Os valores fluorescentes obtidos foram normalizados para o número total de células por tratamento. Parasitos não tratados foram usados como controle negativo.

## 2.4 ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E IMUNOMODULADORA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

### 2.4.1 Cultura Celular

Foram utilizadas linhagens celulares: J774A.1 (monócitos/macrófagos de tecido ascítico de *Mus musculus* - TIB-67; American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA); LLCMK<sub>2</sub> (células epiteliais de rim de macaco Rhesus – ATCC CCL-7), AMJ2-C11 (macrófagos alveolares gerados a partir de camundongos C57BL6 -ATCC® CRL-2456™); e THP-1 (monócitos humanos derivados de um paciente com leucemia monocítica aguda - ATCC® TIB-202TM). As células foram cultivadas em RPMI 1640 (J774A.1, AMJ2-C11 e THP-1) ou meio DMEM (LLCMK<sub>2</sub>), (contendo 1 % de L-glutamina, 10 % de bicarbonato de sódio, 5 % SBF, 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Foram mantidas em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, em incubadora (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### 2.4.2 Ensaio de Citotoxicidade

Foi avaliado os efeitos da citotoxicidade do tratamento com GFA em linhagens celulares (J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, AMJ2-C11 e THP-1), pelo ensaio de MTT realizado conforme descrito anteriormente em BORTOLETI et al., (2021). As células (3x10<sup>4</sup> células/poço) foram cultivadas em uma placa de 96 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) e incubadas com diferentes concentrações de GFA (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 nM) ou meio de cultura sem tratamento, como controle de crescimento celular, por 24 h a 37 °C em 5 % de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas e adicionado MTT (0,33 mg/mL) durante 4 h. O produto MTT (cristais de formazan) foi solubilizado em 100 µL de DMSO (Sigma, ST. Louis, MO, EUA) e a absorbância lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 550 nm.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo de controle calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = (amostras do GFA tratado / amostra D.O não tratada) x 100. A concentração citotóxica para 50 % das células (CC<sub>50</sub>) em cada linhagem celular foi calculada por regressão não linear para a curva de dose-resposta usando o *software* Graph Pad Prism 6.01.

#### 2.4.3 Ensaio Anti-Amastigota

O ensaio anti-amastigota foi realizado conforme descrito anteriormente na literatura (GONÇALVES et al., 2018; KIAN et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018a). Resumidamente, o J774A.1 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram aderidos a lamínulas de vidro redondas de 13 mm e infectados com formas tripomastigotas na proporção de 10:1 (parasitos/célula) por 2 h em um meio FBS-RPMI a 5 % a 37 °C em 5 % de CO<sub>2</sub>. Após serem submetidas à infecção, as células foram lavadas com PBS e incubadas com GFA (nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 nM), meio RPMI (controle negativo) ou DMSO 0,1 % (veículo) por 24 h (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). As células foram coradas com Giemsa e o índice de sobrevivência à infecção foi calculado multiplicando a porcentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos por célula infectada. As experiências foram realizadas em triplicado em três experimentos independentes. A quantificação foi realizada em microscopia de luz em que 200 células foram contadas aleatoriamente.

#### 2.4.4 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por Macrófagos

Para avaliar a produção de ERO, macrófagos ( $10^6$  células/mL) infectados com *T. cruzi* foram tratados com 6,25; 12,5; 25 e 50 nM de GFA conforme descrito Tomiotto-Pellissier (2018). Os parasitos não tratados e células infectadas foram usados como controle negativo, como controle positivo foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.4.5 Produção de Citocinas

Os sobrenadantes do ensaio anti-amastigota foram usados para medir o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), os níveis de interleucina (IL) -6, IL-10 e IL-12 por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (eBiosciences®, EUA). As absorbâncias foram lidas a 450 nm usando um leitor de placas ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO).

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

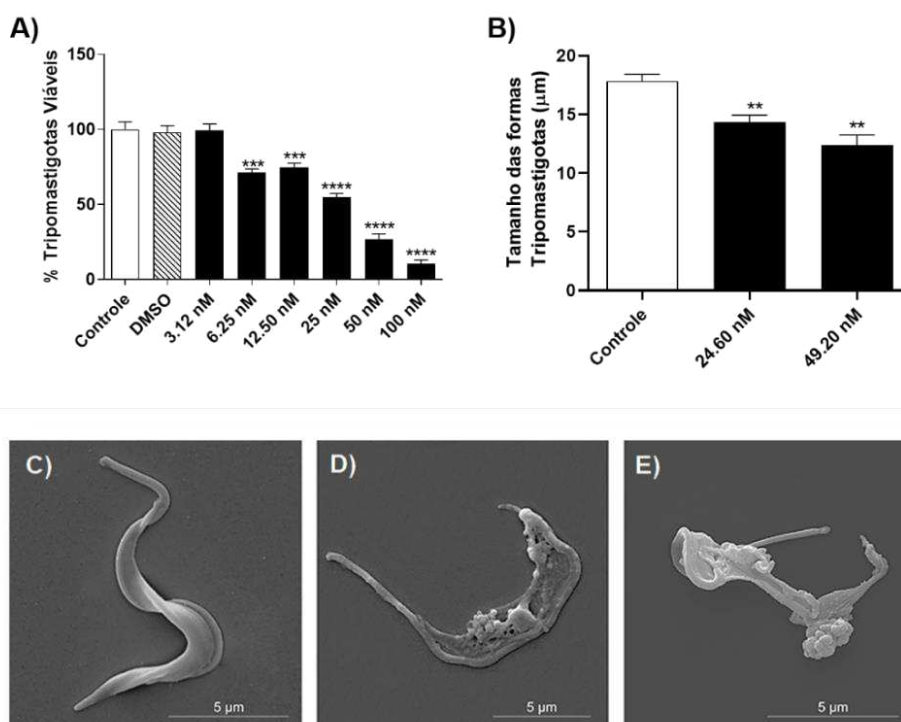
Os dados foram avaliados a partir de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata e foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados no *software* estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA, 6.00). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 GFA INIBE A VIABILIDADE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

A identificação dos GFA e sua caracterização química foram realizadas por ressonância magnética nuclear (RMN) e ponto de fusão (mp). Apenas a menor concentração testada (3,12 nM) de GFA não demonstrou efeito direto sobre as formas tripomastigotas após 24 h de tratamento, enquanto 6,25; 12,5 e 25 nM foram capazes de reduzir a viabilidade em 28,87 %  $\pm$  2,53; 25,36 %  $\pm$  2,81 e em 45,07 %  $\pm$  2,44 respectivamente, em relação ao controle negativo ( $p \leq 0,0001$ ). GFA a 50 e 100 nM causou redução de mais de 70 % na viabilidade das formas tripomastigotas em comparação com o controle negativo ( $p \leq 0,00001$ ). O valor de  $IC_{50}$  obtido ( $24,6 \pm 0,15$  nM) (Figura 2A) e o dobro desse valor ( $2 \times IC_{50}$ , 49,2 nM), foram selecionadas para os experimentos posteriores sobre as formas tripomastigotas.

**Figura 2:** GFA inibe a viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi* e induz alterações morfológicas



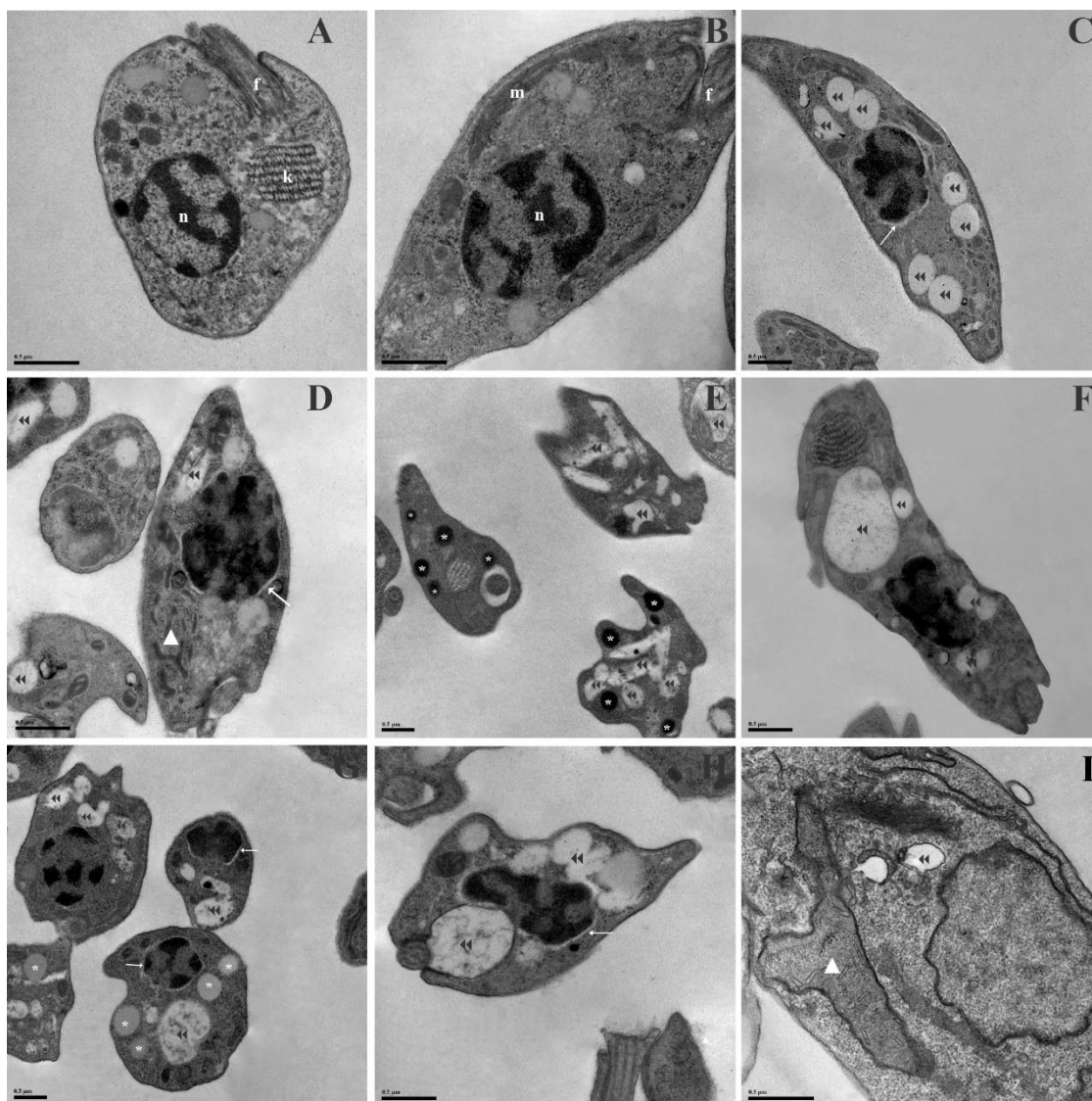
**Legenda:** A) Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com diferentes concentrações de GFA (3,12; 6,25; 12,50; 25; 50 e 100 nM), meio de cultura DMEM (controle), DMSO 0,01 % (veículo) e avaliadas em 24 h. B) Os comprimentos das formas tripomastigotas foram medidos através das imagens de MEV pelo *software* Image-Pro Plus. Pelo menos três imagens de cada condição foram

submetidas à medição. C) Formas tripomastigotas sem tratamento (controle). D) Imagens de MEV mostrando alterações morfológicas nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com IC<sub>50</sub> ou E) 2x IC<sub>50</sub> de GFA. Os valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizadas em duplicata. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05), \*\* (p ≤ 0,01), \*\*\* (p ≤ 0,001), \*\*\*\* (p ≤ 0,0001).

### 3.2 GFA INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Após 24 h de tratamento com IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub> de GFA, uma análise da morfologia dos parasitos, através de MEV, revelou que ambas as concentrações induziram uma diminuição no comprimento do parasito (Figura 2B, D e E), extensa formação de bolhas e severos danos à membrana plasmática. Além disso, os tratamentos apresentaram extravasamento de conteúdo intracelular (Figura 2D e E). Em contrapartida, os parasitos do grupo controle, apresentaram características de tripomastigotas viáveis, com corpo alongado, sem danos à membrana e morfologia intacta (Figura 2C). Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi observado alterações ultraestruturais significativas nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub> de GFA, incluindo a presença de vacúolos autofágicos, edema mitocondrial, corpos lipídicos e desconexão da membrana perinuclear (Figura 3C-I). Em contraste, os parasitos não tratados exibiram características normais, com estruturas bem preservadas (Figura 3A-B).

**Figura 3:** GFA induz alterações ultraestruturais em tripomastigotas de *T. cruzi*.

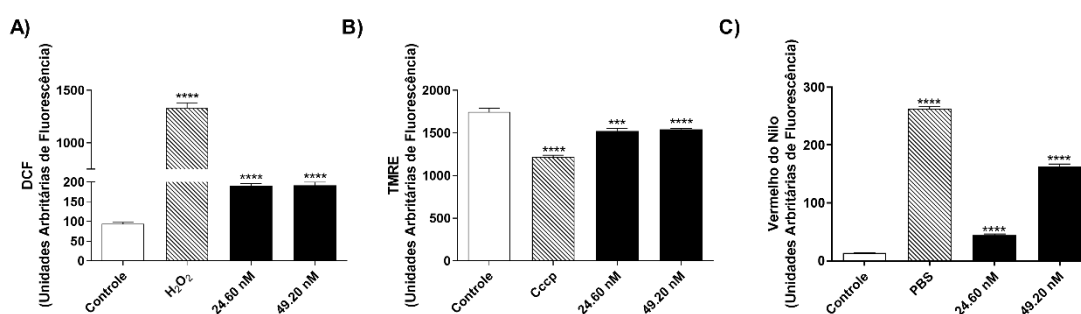


**Legenda:** Alterações ultraestruturais em formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com  $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$  de GFA por 24 h. A-B) formas tripomastigotas não tratadas. C-F) formas tripomastigotas tratados com  $IC_{50}$  de GFA. G-I) formas tripomastigotas tratados com  $2x IC_{50}$  de GFA. f, flagelo; k, cinetoplasto; m, mitocôndria; n, núcleo;  $\blacktriangleright$ , vacúolo autofágico;  $\blacktriangle$ , inchaço mitocondrial; \*, corpos lipídicos;  $\rightarrow$ , desconexão da membrana perinuclear. Barras de escala = 0,5  $\mu$ m.

### 3.3 GFA INDUZ A PRODUÇÃO DE ERO, DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Para comprovar os mecanismos envolvidos na morte de formas tripomastigotas tratadas com GFA, avaliamos a produção de ERO, potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e a formação de corpos lipídicos nos parasitos após o tratamento com  $IC_{50}$  (24,6 nM) e  $2x IC_{50}$  (49,2 nM) por 24 h. Os resultados mostraram um aumento significativo ( $p \leq 0,0001$ ) na produção de ERO totais nos parasitos em comparação com o grupo controle (Figura 4A). Considerando que a produção de ERO está relacionada a distúrbios de organelas, avaliamos o  $\Delta\Psi_m$ , e os resultados mostraram que, após 24 h, o tratamento com GFA foi capaz de promover a redução do  $\Delta\Psi_m$  nos parasitos ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 4B), indicando perda da integridade mitocondrial. A formação de corpos lipídicos é induzida durante o estresse metabólico, incluindo estresse oxidativo, como produção de ERO, formação de vacúolos autofágicos, dano mitocondrial e morte celular apoptótica (CONCATO et al., 2020). Assim, após o tratamento com GFA ( $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$ ), foi possível observar o aumento da intensidade da fluorescência do vermelho do nilo, indicando acúmulo de corpos lipídicos, em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 4C).

**Figura 4:** Avaliação dos níveis de ERO totais, potencial de membrana mitocondrial e corpos lipídicos em tripomastigotas de *T. cruzi* após tratamento com GFA  $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$  por 24 h.

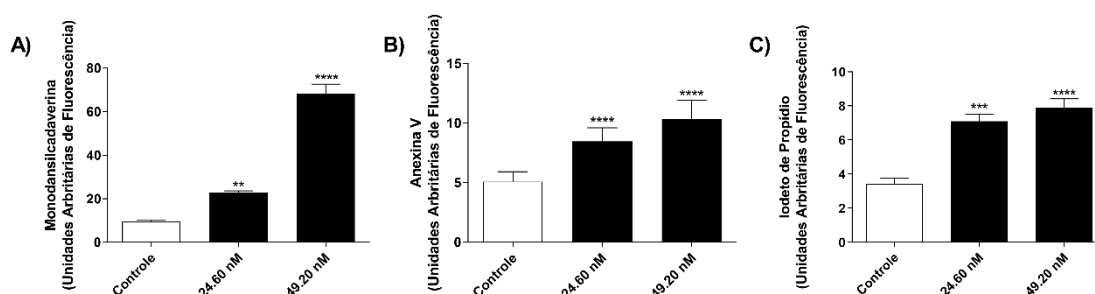


**Legenda:** A intensidade da fluorescência foi quantificada em formas tripomastigotas para determinar A) ERO totais; B) potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e C) corpos lipídios após o tratamento com GFA. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizadas em duplicata. \*\*\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,0001$ ).

### 3.4. GFA INDUZ A FORMAÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS, EXPOSIÇÃO À FOSFATIDILSERINA E PERDA DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Sabendo que o tratamento com GFA foi capaz de promover um efeito tripanocida, alterar a morfologia e os processos metabólicos dos parasitos, investigamos os principais tipos de morte celular. Inicialmente, avaliamos a formação de vacúolos autofágicos nas formas tripomastigotas, após tratamento com IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub> de GFA, e observamos o aumento significativo da intensidade de fluorescência de MDC em relação ao grupo controle (Figura 5A). Posteriormente, para confirmação da morte dos parasitos, foi realizada marcação com anexina V (Figura 5B) e PI (Figura 5C), que revelou aumento significativo da fluorescência para ambos os marcadores em relação ao controle ( $p \leq 0,0001$ ), indicando exposição à fosfatidilserina e danos à membrana plasmática, respectivamente.

**Figura 5:** GFA induz a formação de vacúolos autofágicos, exposição à fosfatidilserina e perda da integridade da membrana plasmática em tripomastigotas de *T. cruzi*



**Legenda:** A intensidade da fluorescência foi quantificada em formas tripomastigotas para determinar vacúolos autofágicos por marcação com MDC A), exposição à fosfatidilserina por marcação com anexina V B) e análise da integridade da membrana plasmática por coloração com iodeto de propídio C). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

### 3.5. GFA NÃO ALTERA A VIABILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES

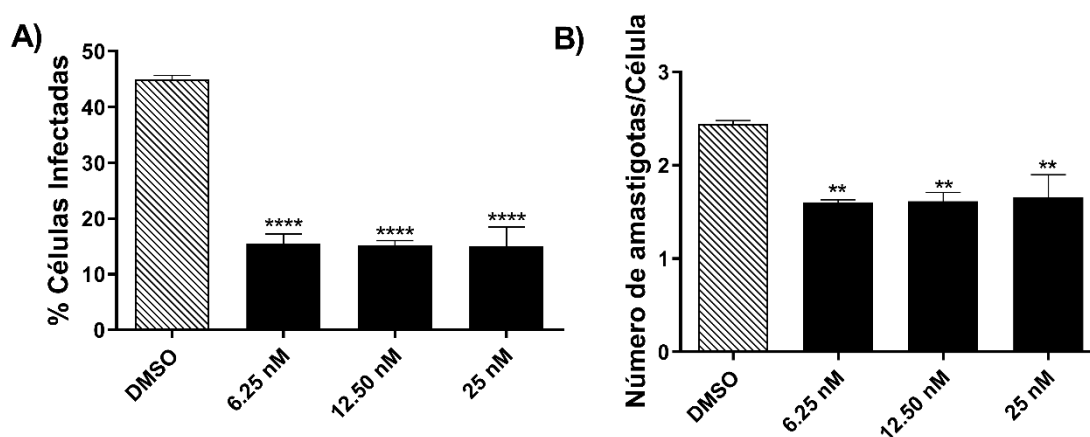
Para verificar se GFA seria tóxico para células de mamíferos, a citotoxicidade das linhagens celulares J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, AMJ2-C11 e THP-1 foram avaliadas por meio de ensaio de MTT após 24 h de tratamento com GFA (6,25; 12,5; 25; 50; 75;

100; 250 e 500 nM). Após esse período, constatamos que GFA nas concentrações de 6,25 a 100 nM não alteraram a viabilidade das diferentes células em comparação ao grupo controle (Tabela 1). Após esses resultados, calculamos o  $CC_{50}$  das linhagens celulares (J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, AMJ2-C11 e THP-1) e obtivemos os valores de  $210,8 \pm 0,29$ ,  $175,6 \pm 1,04$ ,  $135,07 \pm 0,28$  e  $357,1 \pm 1,47$  nM, respectivamente, após 24 horas de tratamento (Tabela 1).

### 3.6. GFA INDUZ A ELIMINAÇÃO DE AMASTIGOTA INTRAMACROFÁGICA DE *T. CRUZI*

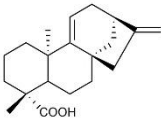
Para avaliar o efeito do GFA contra amastigotas intramacrofágicas de *T. cruzi*, realizamos o ensaio anti-amastigota, que analisa a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas após 24 h de tratamento. Nossos resultados mostraram uma redução significativa na porcentagem de macrófagos infectados (65,45; 72,2 e 72,2 %) para todas as concentrações testadas (6,25; 12,5 e 25 nM, respectivamente) (Figura 6A), bem como o número médio de amastigotas por macrófago ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 6B) em comparação com o grupo controle. Com base nisso, o valor estimado de  $IC_{50}$  de GFA em formas amastigotas foi de  $0,86 \pm 0,18$  nM e o índice seletividade (IS) foi de 245,1 nM (Tabela 1).

**Figura 6:** Efeito de GFA em J774A.1 infectado com *T. cruzi*



**Legenda:** J774A.1 infectado com *T. cruzi* foram tratados por 24 h com GFA em 6,25, 12,50 e 25 nM, e A) a porcentagem de células infectadas e B) o número de amastigotas por célula. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizadas em duplicata. \*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

**Tabela 1:** IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e IS do GFA

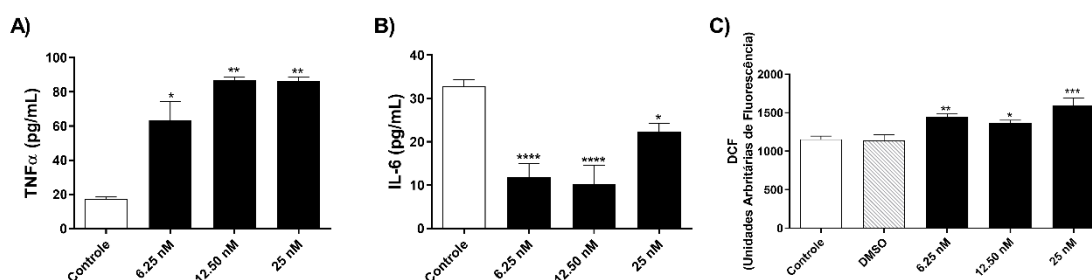
	Forma Tripomastigota	Forma Amastigota	LLCMK <sub>2</sub>	THP-1	AMJ2-C11	J774.A1	
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)	CC <sub>50</sub> (nM)	IS
	24.6 (± 0.1)	0.86 (0.2)	175.6 (±1.0)	357.1 (±1.4)	135.07 (±0.3)	210.8 (± 0.3)	245.1

**Legenda:** Experimentos realizados em 24 h. CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica para 50 % das células. IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória para 50 % dos parasitos. IS: Índice de seletividade, onde é determinado pela razão entre CC<sub>50</sub> J774.A1/IC<sub>50</sub> amastigota intracelular. GFA: ácido grandiflorênico. LLCMK<sub>2</sub>: células epiteliais renais de macaco Rhesus. J774.A1: macrófagos/monócitos extraído de ascite de sarcoma de células reticulares de *Mus musculus*. AMJ2-C11: linhagem celular de macrófagos alveolares geradas a partir de camundongos C57BL6. THP-1: linhagem celular monocítica humana derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda.

### 3.7 GFA MODULA OS NÍVEIS DE CITOCINAS E ERO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *T. CRUZI*

Para determinar se o tratamento com GFA tem ação tripanocida desencadeada pela imunomodulação de macrófagos, avaliamos o perfil de citocinas dessas células infectadas pelo *T. cruzi*, após 24 h de tratamento. Os dados mostraram aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e redução dos níveis de IL-6, nas concentrações testadas (6,25; 12,5 e 25 nM) (Figura 7A e 6B). Os níveis de citocinas IL-10 e IL-12p70 não diferiram do grupo controle (dados não mostrados). Ao avaliar os níveis de ERO de macrófagos infectados com *T. cruzi* e tratados com GFA (6,25; 12,5 e 25 nM) por 24 h, observamos que o tratamento foi capaz de aumentar a produção de ERO em todas as concentrações; 6,25 nM ( $p \leq 0,01$ ), 12,5 nM ( $p < 0,05$ ) e 25 nM ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 7C) em relação ao grupo de controle.

**Figura 7:** GFA modula os níveis de citocinas e ERO em macrófagos infectados com *T. cruzi*.



**Legenda:** Os seguintes métodos foram usados para avaliar a células de linhagem J774A.1 infectadas

com *T. cruzi*, submetidas ao tratamento com GFA (6,25; 12,50 e 25 nM) por 24 h. Níveis de A) TNF- $\alpha$  e B) IL-6 produzidos (barras para cima) determinados por ELISA. C) ERO totais foram medidos pelo aumento na fluorescência causada pela conversão do corante não fluorescente, H<sub>2</sub>DCFDA, em fluorescente, DCF. \* Diferença significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ).

## 4 DISCUSSÃO

A busca por novos compostos que auxiliem na melhora clínica de pacientes com a doença de Chagas crônica ou que sejam capazes de promover a cura dessa parasitose ainda é uma questão urgente por representar um grande problema de saúde mundial (RIBEIRO et al., 2020). Os diterpenos são uma das principais classes de compostos presentes nas plantas para as quais a literatura mostra uma série de atividades farmacológicas (GARCÍA; DE OLIVEIRA; BATISTA, 2007).

Em nosso estudo prévio, de acordo com os parâmetros *in silico*, apresentou características favoráveis para possível desenvolvimento de fármacos (BORTOLETI et al., 2018). Além disso, a literatura trás estudos *in vitro* que complementam essa predição de GFA como uma molécula líder. Batista et al., (2013) mostraram que o GFA não apresenta citotoxicidade para uma linhagem celular de hepatoblastoma humano (HepG2), e nosso estudo anterior mostrou que GFA não causou hemólise em sangue de ovino ou alterou a viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (BORTOLETI et al., 2018). Corroborando com esses dados, observamos neste estudo que na faixa de concentrações de GFA de 6,25 a 100 nM não houve citotoxicidade nas quatro diferentes linhagens celulares testadas (J774A.1, LLCMK<sub>2</sub>, AMJ2-C11 e THP-1).

Batista e colaboradores, (1999) mostraram o efeito tripanocida do GFA, isolado da *Wedelia paludosa*, nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* a partir da menor concentração testada (0,68 mg/mL). O nosso trabalho teve como objetivo complementar esse estudo, fornecendo novos dados sobre os principais mecanismos envolvidos na morte desses parasitos, além de verificar se o composto também seria capaz de induzir a eliminação das formas amastigotas intracelulares sem causar danos as células hospedeiras. Os resultados mostraram que o GFA atua sobre formas tripomastigotas, apresentando um IC<sub>50</sub> de 24,60 ± 0,15 nM, dados semelhantes aos obtidos por Bortoleti et al., (2018) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (25 ± 1,48 nM).

Os resultados corroboram com estudos anteriores realizados com este composto (BORTOLETI et al., 2018) e outros diterpenos/terpenos, como ácido diidroabiético (GONÇALVES et al., 2018), os diterpenos presentes no óleo de copaíba (NAKAMURA et al., 2012) contra *L. amazonensis*, bem como terpenos isolados do extrato bruto de *Croton cajucara* (CAMPOS et al., 2010) contra *T. cruzi*, mostrando

que esses compostos naturais são capazes de causar danos direto aos respectivos parasitos.

Portanto, como nossos resultados mostraram que o GFA tem efeito anti-tripomastigota, investigamos os principais mecanismos possivelmente envolvidos na eliminação desse parasito. Sabe-se que diversos produtos naturais apresentam atividade tripanocida por interferir no equilíbrio redox dos parasitos, induzindo a síntese de moléculas microbidas como as ERO (ATAWODI et al., 2003). Altos níveis de ERO podem afetar a integridade das organelas do parasito e a homeostase do metabolismo lipídico intracelular, resultando em distúrbios nos processos de síntese e decomposição lipídica (JIN et al., 2018).

Uma organela fundamental para tripanossomatídeos, incluindo *T. cruzi*, é a sua mitocôndria única, que está associada às defesas antioxidantes rudimentares do parasito, e a síntese de ATP essencial para sua sobrevivência (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014; SMIRLIS et al., 2010). Na presença de ERO, a função mitocondrial das formas tripomastigotas pode ser afetada, causando uma redução do  $\Delta\Psi_m$ . Além disso, tanto ERO quanto disfunção mitocondrial são indutores do acúmulo de corpos lipídios, uma marca registrada do estresse celular (LEE et al., 2013; TIRINATO et al., 2019). Assim, podemos inferir que o tratamento com GFA em formas tripomastigotas induziu a produção de ERO, causando dano mitocondrial e acúmulo de corpos lipídicos, que culmina em estresse celular e morte.

Posteriormente, foi investigado que tipo de morte celular foi induzida pelo tratamento com GFA. A autofagia é uma via biológica associada à reciclagem celular por meio da remoção de componentes celulares danificados, que podem ser ativados na presença de estresse celular, formando vacúolos autofágicos (BOMBAÇA et al., 2018; MENNA-BARRETO et al., 2009; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2015). A ocorrência de indução contínua de autofagia pode levar à perda do equilíbrio autofágico e morte celular progressiva dos parasitos (MENNA-BARRETO, 2019).

Essa progressão pode culminar em apoptose, também conhecida como processo de morte celular programada, promovendo a autodestruição celular de forma controlada a partir de diversos eventos bioquímicos (FAN; ZONG, 2013). Os principais fenótipos apoptóticos presentes nos tripanossomatídeos são a exposição à fosfatidilserina, a perda do potencial da membrana mitocondrial, o encolhimento celular e a formação de bolhas e corpos apoptóticos na membrana plasmática (MENNA-BARRETO, 2019). Em estágios tardios, as células apoptóticas não

removidas podem evoluir para ruptura da membrana plasmática, caracterizando um processo apoptótico tardio (BORTOLETI et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018a). Todas essas características foram encontradas nos parasitos tratados com GFA. Assim, esses dados permitem concluir que o tratamento com GFA causou um estresse celular exacerbado às formas tripomastigotas, o que levou os parasitos a eventos apoptóticos (DOLAI; ADAK, 2014).

As alterações morfológicas e ultraestruturais observadas por MET e MEV respectivamente, como diminuição do comprimento do corpo do parasito, extravasamento aparente do conteúdo citoplasmático, danos severos à membrana celular, além da presença de vacúolos autofágicos e edema mitocondrial, confirmam que o GFA induz efeitos que culminam em processo semelhante à apoptose, conforme descrito na literatura (MENNA-BARRETO, 2019)

Sabe-se que a multiplicação do *T. cruzi* ocorre no interior das células hospedeiras, necessitando fortemente de um composto capaz de eliminar as formas amastigotas e/ou inibir seu crescimento e divisão sem causar danos ao hospedeiro (VILLALTA; RACHAKONDA, 2019). Após comprovar que o GFA não induziu citotoxicidade em diferentes linhagens celulares, foi avaliada sua ação anti-amastigota em macrófagos J774A.1 infectados com *T. cruzi*.

Os resultados obtidos mostraram que o GFA também foi eficaz na eliminação das formas amastigotas, atuando tanto na redução do percentual de células infectadas quanto no número de parasitos intracelulares. Desse modo, o GFA se mostrou um composto candidato a fármaco, uma vez que apresentou características importantes, como ser atóxico e ter efeito contra parasitos intracelulares com  $IC_{50} < 10 \mu M$  e  $IS > 10$  (KATSUNO et al., 2015). O GFA tem se mostrado eficiente na eliminação de formas amastigotas de *L. amazonensis* de macrófagos peritoneais murinos, apresentando anteriormente  $IS$  de 284,7 (BORTOLETI et al., 2018). Por sua vez, Miranda e colaboradores (2015) mostraram que o KA, outro diterpeno caurano, também exibiu atividade anti-amastigota nas mesmas condições. Outros estudos realizados com essa classe de compostos mostraram resultados significativos contra *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. donovani*, com  $IS$  elevado ( $> 10$ ) (NOGUEIRA et al., 2016b). De acordo com nossos resultados, o GFA tem uma chance promissora de se tornar uma molécula líder no estudo de medicamento antiparasitário.

Após avaliar o efeito anti-amastigota exercido pelo GFA, o objetivo deste trabalho foi determinar os principais mecanismos envolvidos na eliminação intracelular desse parasito, para os quais avaliamos os níveis de citocinas. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica cuja função no curso da doença de Chagas é contraditória. Se, por um lado, alguns autores mostraram sua importância no controle do número de parasitos (GAO; PEREIRA, 2002), por outro lado, outros demonstraram um papel prejudicial no desfecho da doença, aumentando o dano tecidual e interferindo nos parâmetros hematológicos (MARINI et al., 2011). Os níveis de IL-6 estavam baixos em macrófagos infectados tratados com GFA, sugerindo que essa citocina não estava envolvida no efeito anti-amastigota do tratamento, portanto, tal redução poderia exercer função protetora de seus efeitos patogênicos.

Os níveis de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória intrinsecamente relacionada à defesa antimicrobiana contra *T. cruzi*, que desempenha um papel importante na ativação de macrófagos, e consequente efeito microbicida (LIMA et al., 1997; ROGGERO et al., 2004; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018a) foi maior nos macrófagos infectados e tratados. Sabe-se que ERO são os principais mediadores a jusante do TNF- $\alpha$  responsáveis pelo efeito antimicrobiano contra diversos patógenos (BLASER et al., 2016). Embora alguns autores sugerem que a ação das ERO favorece a proliferação de formas amastigotas de *T. cruzi* (PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018), muitos estudos mostram o papel fundamental das ERO na ação anti-*T. cruzi* de diversos compostos naturais (BOMBAÇA et al., 2019). Em conjunto, esses resultados mostraram que o GFA foi capaz de reduzir a infecção por meio do TNF- $\alpha$  e do mecanismo dependente de ERO.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, mostramos que o tratamento *in vitro* com baixas concentrações de GFA, um composto isolado da *S. trilobata*, possui potente atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, aumentando os níveis de ERO, disfunção mitocondrial, formação de corpos lipídicos e vacúolos autofágicos, induzindo morte semelhante à apoptose. Além disso, promoveu a eliminação de parasitos intracelulares pela via do TNF- $\alpha$  /ERO, sem apresentar citotoxicidade celular. Nossos resultados enfatizam o potencial do GFA em se tornar um candidato promissor a um medicamento para o tratamento de infecções parasitárias como a doença de Chagas.

### Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPQ N° 01/2016 – Universal – Processo 408384/2016-6).

### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Phileno Pinge Filho do Laboratório de Imunopatologia Experimental pelo fornecimento e assistência na manutenção do *T. cruzi*

### Declaração de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os trabalhos realizados podemos concluir que os compostos isolados da *Sphagneticola trilobata*, destacando-se os diterpenos cauranos são compostos favoráveis para o processo de biotransformação fúngica pelo fungo *C. elegans*, uma vez que foi possível obter novos compostos com atividade superior ao material de partida. Podemos inferir que o processo de biotransformação poderia ser uma alternativa promissora na modificação estrutural do GFA, podendo melhorar ainda mais sua atividade contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

## REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. **Current medicinal chemistry**, v. 6, n. 5, p. 359–74, maio 1999.
- ABRÃO, F. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, 21 dez. 2015.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, abr. 2011.
- ALVIANO, C. S. et al. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, n. 1, p. 17–23, 1992.
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6299–6303, 2010.
- 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.
- ARAKAWA, N. S. et al. Unusual biotransformation products of the sesquiterpene lactone budlein A by *Aspergillus* species. **Phytochemistry**, v. 96, p. 92–100, 2013.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 16–29, 1 jan. 2009.
- ATAWODI, S. E. et al. *In vitro* trypanocidal effect of methanolic extract of some Nigerian savannah plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 9, p. 360–369, 2003.
- AVILA, C. Terpenoids in marine heterobranch molluscs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, 2020.
- BACCARIN, T. et al. Artigo Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia*. v. 19, n. November 2008, p. 612–616, 2009.
- BALAÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1 abr. 1998.

- BALEKAR, N. et al. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1178–1184, 2012a.
- BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 817–824, 14 jun. 2012b.
- BASTOS, D. Z. L. et al. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 834–839, 2007.
- BATISTA, R. et al. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. January, p. 36–40, 2009.
- BATISTA, R. et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 168–176, 2013.
- BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta medica**, v. 65, n. 3, p. 283–284, 1999.
- BERBERT, T. R. N. et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.
- BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 1 abr. 2016.
- BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85–89, 1998.
- BLUM, M. S.; BRAND, J. A. **Social Insect Pheromones: Their Chemistry and Function**. **AM. ZOOLOGIST**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article/12/3/553/1997754>>. Acesso em: 11 jun. 2021.
- BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: The biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 345–347, 2004.
- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**, v. 23, n. 11, 28 out. 2018.
- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 408–418, 1 jan. 2019.

- BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. Enantioselective biotransformation of propranolol to the active metabolite 4-hydroxypropranolol by endophytic fungi. **Quimica Nova**, v. 34, n. 8, p. 1354–1357, 2011.
- BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology research**, p. 1–11, 2016.
- BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11–20, 2018.
- BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153536, 1 maio 2021.
- BRAHMACHARI, G. Bioactive natural products: Opportunities and challenges in medicinal chemistry. **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**, p. 1–670, 1 jan. 2011.
- BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. [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.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CADENA-GONZÁLEZ, A. L.; SØRENSEN, M.; THEILADE, I. Use and valuation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquirá, Boyacá, Colombia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 23, 11 abr. 2013.
- CALDWELL, G. et al. ADME Optimization and Toxicity Assessment in Early- and Late-Phase Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 965–980, 17 out. 2009.
- CAMPOS, M. C. O. et al. Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: Activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1193–1204, 2010.
- CAO, H. et al. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 214–223, 1 jan. 2015.
- CARBON-MANGELS, M.; HUTTER, M. C. Selecting relevant descriptors for classification by Bayesian estimates: A comparison with decision trees and support

vector machines approaches for disparate data sets. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 10, p. 885–895, 1 out. 2011.

CARIDHA, D. et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 106–117, 1 dez. 2019.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.

CHEN, Y. et al. Biotransformation of cyperenoic acid by *Cunninghamella elegans* AS 3.2028 and the potent anti-angiogenic activities of its metabolites. **Fitoterapia**, v. 118, p. 32–37, 1 abr. 2017.

CHENG, F. et al. Insights into molecular basis of cytochrome P450 inhibitory promiscuity of compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2482–2495, 24 out. 2011.

CHENG, F. et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 26 nov. 2012.

CHOUDHARY, M. I. et al. Microbial transformation of sesquiterpenes, (-)-Ambrox® and (+)-sclareolide. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 10, p. 2685–2694, 2004.

CONCATO, V. M. et al. 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol induces cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109133, 24 maio 2020.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** Fundacao Oswaldo Cruz, , 2002.

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

CZUB, J.; BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes-A molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2616–2626, 1 out. 2007.

DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity. **Planta Medica**, v.

62, n. 6, p. 557–559, 1996.

DA COSTA, R. M. et al. In vitro cytotoxicity and structure-activity relationship approaches of ent-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. **Phytochemistry**, v. 156, p. 214–223, 1 dez. 2018.

DA SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

DA SILVA FERREIRA, D. et al. Natural products and Chagas' disease: The action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, p. 243–256, 2013.

DAI, J. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. **EXCLI journal**, v. 12, p. 479–90, 2013.

DE CARVALHO, G. J. A. . et al. DITERPENOS, TRITERPENOS E ESTERÓIDES DAS FLORES DE *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 24–26, 2001.

DE OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, C. A. M.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 95–98, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. Third Edit ed. [s.l: s.n.]. v. 1

DO NASCIMENTO, J. S.; CONCEIÇÃO, J. C. S.; DE OLIVEIRA SILVA, E. Biotransformation of Coumarins by Filamentous Fungi: An Alternative Way for Achievement of Bioactive Analogs. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 568–577, 23 ago. 2018.

DOLAI, S.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 197, n. 1–2, p. 1–8, out. 2014.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.

DUBE, A. K.; KUMAR, M. S. Biotransformation of bromhexine by *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata* and *C. blakesleeana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 259–267, 1 abr. 2017.

FAN, Y. J.; ZONG, W. X. The cellular decision between apoptosis and autophagy.

**Chinese Journal of Cancer**, v. 32, n. 3, p. 121–129, 2013.

FELCZAK, A. et al. Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8872–8880, 1 maio 2016.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro de Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4, p. 395–439, 2009.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology** 2017 15:4, v. 15, n. 4, p. 217–231, 1 abr. 2017.

FRAGA, B. M. et al. Microbial transformation of two 15 $\alpha$ -hydroxy-ent-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 66, n. 1, p. 227–234, 2 jan. 2010.

FRAGA, B. M. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 $\beta$ -acetoxy derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). **Phytochemistry**, v. 81, p. 60–70, set. 2012.

FRANCO-PAREDES, C. et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101565, 29 jan. 2020.

FREITAS, T. P. et al. Active substances against trypanomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiol Res**, v. 157, n. 3, p. 201–206, 2002.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: **International Association for Plant Taxonomy**. [s.l.] International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 167–170, 2002.

GARCÍA, P. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 455–483, 13 mar. 2007.

GERVAZONI, L. F. O. et al. Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 0, p. 1031, 23 nov. 2020.

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.

GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, n. May, p. 224–232, 2018.

GONZÁLEZ, M. A. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. **Natural product reports**, v. 32, n. 5, p. 684–704, 1 maio 2015.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: **American Trypanosomiasis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. p. 321–338.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 1 ago. 2002.

HANSEN, K. et al. Benchmark data set for *in silico* prediction of Ames mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 9, p. 2077–2081, 28 set. 2009.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 1, p. 88–94, fev. 2001.

HANSON, J. R. Diterpenoids of terrestrial origin. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1654–1663, 1 dez. 2015.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2831–2846, nov. 2007.

HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kaurane and kaurene diterpenes from the stem bark of *Xylopia acutiflora*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2134–2135, jan. 1982.

HISSA, B. et al. Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates *Trypanosoma cruzi* Invasion of Host Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1583, mar. 2012.

HOPKINS, A. L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682–690, 20 out. 2008.

HUTCHISON, M.; LEWER, P.; MACMILLAN, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of eighteen derivatives of ent-kaur-16-en-19-oic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2363–2366, 1984.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. e69–e75, 15 nov. 2010.

- JAÉN-GIL, A. et al. Fungal treatment of metoprolol and its recalcitrant metabolite metoprolol acid in hospital wastewater: Biotransformation, sorption and ecotoxicological impact. **Water Research**, v. 152, p. 171–180, 2019.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 502, 6 dez. 2018.
- JIN, Y. et al. Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in hepg2 cells by increasing perilipin 2 expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.
- KATOCH, M.; SALGOTRA, A.; SINGH, G. Endophytic fungi found in association with *Bacopa monnieri* as potential producers of industrial enzymes and antimicrobial bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 714–722, 2014.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.
- 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.
- KEUM, Y. S.; LEE, Y. H.; JEONG-HAN, K. Metabolism of methoxychlor by *Cunninghamella elegans* ATCC36112. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7931–7937, 9 set. 2009.
- KIAN, D. et al. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. November 2017, p. 1294–1301, 2018.
- KUNDU, S.; DEY, A.; BANDYOPADHYAY, A. Stimulation of in vitro morphogenesis, antioxidant activity and over expression of kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bertoni by chlorocholine chloride. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 10, p. 2683–2693, 1 set. 2014.
- LAGUNIN, A. et al. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 806–810, 1 ago. 2009.
- LAKE, B. G.; PRICE, R. J. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. **Xenobiotica**, v. 43, n. 1, p. 41–53, jan. 2013.
- LAMBERT, J. B.; VAGENAS, A. R. Dependence of the  $\gamma$  carbon-13 shielding effect on

the dihedral angle. **Organic Magnetic Resonance**, v. 17, n. 4, p. 265–269, 1 dez. 1981.

LANG, K. et al. Biomonitoring UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>2</sup> and HPLC-UV thermostability study of the aerial parts of *Sphagneticola trilobata* ( L .) Pruski , Asteraceae. **Talanta**, v. 167, n. February, p. 302–309, 2017.

LECH, J. J.; BEND, J. R. Relationship between biotransformation and the toxicity and fate of xenobiotic chemicals in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. VOL.34, p. 115–131, fev. 1980.

LEE, S.-J. et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Formation of Lipid Droplets as a Generalized Response to Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

LI, X. et al. Structures and Biological Properties of the Chemical Constituents from the Genus *Wedelia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 5, p. 823–836, 1 maio 2007.

LIMA, E. C. et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 457–65, fev. 1997.

LIMA, M. A. S. et al. Aspergillus Niger: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2029–2059, 2019.

LIN, L. G. et al. Naturally occurring diterpenoid dimers: Source, biosynthesis, chemistry and bioactivities. **Planta Medica**, v. 82, n. 15, p. 1309–1328, 1 ago. 2016.

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.

LIRA, R. et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: Potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 537–546, 1 maio 2001.

LOWE, H. et al. molecules Antiviral Activity of Jamaican Medicinal Plants and Isolated Bioactive Compounds. 2021.

MA, B. et al. Biotransformation of metoprolol by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 7, p. 1067–1074, 2007.

MA, B. J. et al. ent-Kaurane diterpenoids from the plant *Wedelia trilobata*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 3, p. 107–111, 1 jun. 2013.

MACHADO, P. DE A. et al. VOSalophen: a vanadium complex with a stilbene

derivative—induction of apoptosis, autophagy, and efficiency in experimental cutaneous leishmaniasis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 929–939, 2017.

MACIEL et al. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, 2006.

MACRI, J. A. et al. Immunomodulatory and Antioxidant properties of Kaurenoic acid on macrophages of BALB/c *in vitro*. **American Journal of Immunology**, v. 10, n. 4, p. 183–188, 2014.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera Willdenow*, *Byrsonima crassifolia Kunth*, *Sweetia panamensis Yakovlev* and the leaves of *Sphagneticola trilobata Hitchcock*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 430–433, 21 abr. 2009.

MANDEL, J. R. et al. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 28, p. 14083–14088, 2019.

MARCHESE ROBINSON, R. L.; GLEN, R. C.; MITCHELL, J. B. O. Development and comparison of hERG blocker classifiers: Assessment on different datasets yields markedly different results. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 5, p. 443–458, 16 maio 2011.

MARCONDES-ALVES, L. et al. Kaurenoic acid extracted from *Sphagneticola trilobata* reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in mice. **Natural Product Research**, v. 6419, n. December, p. 1–4, 2017.

MARINI, V. et al. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* modulates the profiles of immunoglobulins and IL-6 at local and systemic levels in the early phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 32–37, 2011.

MARQUINA, S. et al. Hydroxylation of the diterpenes ent-kaur-16-en-19-oic and ent-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17–18, p. 2017–2022, 1 dez. 2009.

MARTINS, C. H. G. et al. Kaurenoic acid and its sodium salt derivative: Antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and their mechanism of action. **Future Microbiology**, v. 13, n. 14, p. 1585–1601, 1 nov. 2018.

- MENEZES, C. et al. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 471–479, set. 2011.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, fev. 2009.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 1 fev. 2019.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed research international**, v. 2014, p. 614014, 2014.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. **Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis**, 16 dez. 2015.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 286, 8 ago. 2012.
- MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 392918, 2015.
- MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO – Cyclic GMP – Protein Kinase G – ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of Natural Products**, n. 75, p. 896–904, 2012.
- MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 1 out. 2015.
- MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55–66, 2010.
- MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.
- NAKAMURA, C. V. et al. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- NASCIMENTO, J. S. DO et al. Mapping the Biotransformation of Coumarins through

- Filamentous Fungi. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 19, 29 set. 2019.
- NATH, A. et al. Quantifying and predicting the promiscuity and isoform specificity of small-molecule cytochrome P450 inhibitors. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 12, p. 2195–2203, dez. 2010.
- NDOM, J. C. et al. New alkamide and ent-kaurane diterpenoid derivatives from *Senecio erectitoides* (Asteraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 4, p. 201–206, 17 dez. 2010.
- NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y. J.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 318–326, 1 dez. 2017.
- NOGUEIRA, M. S. et al. ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1–14, set. 2016.
- NURBY, R. et al. In vivo anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*. **Revista Facultad de Farmacia**, 2017.
- OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial Effects of a Lipophilic Fraction and Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark Extracts of *Annona senegalensis*. v. 2012, 2012.
- OKOYE, T. C. et al. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38–43, 2013.
- OLIVEIRA, L. C. et al. Schistosomicidal activity of kaurane, labdane and clerodane-type diterpenes obtained by fungal transformation. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 34–40, 1 nov. 2020.
- OPAS. **OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2021-opas-70-das-pessoas-com-chagas-nao-sabem-que-estao-infectadas>>. Acesso em: 30 jul. 2021.
- ORTIZ, J. V. et al. Cardiac evaluation in the acute phase of chagas' disease with post-treatment evolution in patients attended in the state of Amazonas, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, n. 3, p. 240–246, 1 mar. 2019.
- PAGLIARA, V. et al. Bioactive ent-kaurane diterpenes oridonin and irudonin prevent cancer cells migration by interacting with the actin cytoskeleton controller ezrin.

- International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–19, out. 2020.
- PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2018.
- PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 1 dez. 2002.
- PANDA, S. K.; LUYTEN, W. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. **Parasite**, v. 25, p. 10, 2018.
- PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. . nov. 2012, p. 1959–1972.
- PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1731–1740, dez. 2012.
- PASSERO, L. F. D. et al. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1275–1286, 2 out. 2018.
- PEARCE, C. M.; LUSHNIKOVA, M. V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, n. 3–4, p. 87–91, 4 ago. 2006.
- PECHWANG, J. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Psilocybe cubensis*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 10, p. 905–914, jun. 2010.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: Epidemiology, clinical presentation and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, jun. 2012.
- PERVAIZ, I. et al. Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review). **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 49, n. 5, p. 435–49, 2013.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1–5, jan. 2012.
- PFEIFER BARBOSA, A. L. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera*

*reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 94–100, abr. 2019.

PHAM THE, H. et al. In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 4, p. 376–385, 18 abr. 2011.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, nov. 2010.

PISKA, K. et al. *Cunninghamella* Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 107–117, 21 jan. 2016.

POTHULURI, J. V et al. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3654–9, 1 nov. 1992.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. AUG, 6 ago. 2015.

RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2014.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 951–960, 1 mar. 2013.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

RIBEIRO NETO, J. A. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112547, jan. 2020.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7–17, 2020.

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

ROGGERO, E. et al. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection

- in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 123–131, jun. 2004.
- ROQUE, N.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. 2008.
- RUAN, Y. et al. Specific 12 $\alpha$ -hydroxylation of grandiflorenic acid by permeabilised fungus *Fusarium graminearum*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 9, p. 677–679, 3 maio 2014.
- SALES, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.
- SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625–634, 1985.
- SANTOS, R. I. DOS. Metabolitos básicos e origem dos metabolitos secundários. In: UFSC (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>o</sup> ed. ed. Florianópolis: [s.n.]. p. 403–434.
- SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567–569, 1 ago. 2003.
- SAÚDE;, M. DA. **Boletim epidemiológico - Doença de Chagas**. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em: 30 jul. 2021.
- SCHWIRKOWSKI, P. **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: *Sphagneticola trilobata***. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=7280](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7280)>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- SESSA, D. P. et al. 15 $\beta$ -Senecieryl-oxy-ent-kaur-16-en-19-oic Acid, a Diterpene Isolated from *Baccharis lateralis*, as Promising Oral Compound for the Treatment of Schistosomiasis. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 12, p. 3744–3750, dez. 2020.
- SHEN, J. et al. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 6, p. 1034–1041, 28 jun. 2010.
- SIBBR. ***Sphagneticola trilobata* (L) Pruski**. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/285825#classification>>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- SILVA, E. A. et al. The biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 3, p. 397–400, 1 out. 1999.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis*

and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–31, ago. 2009.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 17 nov. 2010.

SMITHA, M. S.; SINGH, S. .; SINGH, R. Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 4, n. 2, 2017.

SOUSA, I. et al. Biotransformation of diterpenes from *Copaifera sp.* oleoresins using filamentous fungi. **Planta Medica**, v. 4, n. S 01, p. Tu-SL-03, 24 out. 2017.

SOUSA, R. DOS S. et al. POTENCIAL DA ESPÉCIE *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski PARA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, p. 720–730, 2018.

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

STROPPA, P. H. F.; ANTINARELLI, L. M. R.; CARLO, A. M. L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. . Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3034–3045, 2017.

SULTAN, S. et al. Fungal transformation of cedryl acetate and  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay, quantum mechanical calculations and molecular docking studies of its metabolites. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 764–770, 1 abr. 2013.

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

TAKAHASHI, J. A. et al. molecules The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. **Molecules**, v. 19, p. 1856–1886, 2014.

TAVEEPANICH, S. et al. Biotransformation of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Absidia blakesleeana* and *Rhizopus oligosporus*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 11, p. 1050–1058, 2010.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 10 out. 2013.

- TEIXEIRA, T. L. et al. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. **Pathogens and Global Health**, v. 108, p. 30–36, 2014.
- TIRINATO, L. et al. ROS and Lipid Droplet accumulation induced by high glucose exposure in healthy colon and Colorectal Cancer Stem Cells. **Genes and Diseases**, 25 set. 2019.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf ex. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, n. September 2017, p. 662–672, 2018a.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 31 out. 2018b.
- TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 6 jan. 2012.
- UENO, A. K. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, n. October 2017, p. 55–58, 2018.
- 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.
- VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). **Chemical reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579–612, 10 set. 2014.
- VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.
- VENISETTY, R.; CIDDI, V. Application of Microbial Biotransformation for the New Drug Discovery Using Natural Drugs as Substrates. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 153–167, 25 mar. 2005.
- VILLA-RUANO, N.; LOZOYA-GLORIA, E.; PACHECO-HERNÁNDEZ, Y. Kaurenoic Acid: A Diterpene With a Wide Range of Biological Activities. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 51p. 151–174.
- VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161–

1174, 2019.

WANG, J. et al. Development of reliable aqueous solubility models and their application in druglike analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1395–1404, jul. 2007.

WANG, R.-F. et al. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 55–61, 1 jul. 2000.

WATANABE, S.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; FU, S. Structural Elucidation of Metabolites of Synthetic Cannabinoid UR-144 by *Cunninghamella elegans* Using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **AAPS Journal**, v. 20, n. 2, p. 1–9, 1 mar. 2018.

WEITZMAN, I.; CRIST, M. Y. Studies with Clinical Isolates of *Cunninghamella* II. Physiological and Morphological Studies. **Mycologia**, v. 72, n. 4, p. 661–669, jul. 1980.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty** 2018 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–9, 18 jun. 2018.

WHO. **Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

WHO. **Neglected tropical diseases: enhancing safe treatment for more than 1 billion people annually**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/16-08-2021-neglected-tropical-diseases-enhancing-safe-treatment-for-more-than-1-billion-people-annually>>. Acesso em: 25 ago. 2021a.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 30 jul. 2021b.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 27 jul. 2021c.

WHO | Prevention of Chagas disease. **WHO**, 2016.

WILLIAMS, A. J. et al. Biotransformation of flumequine by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Chemosphere**, v. 67, n. 2, p. 240–243, 1 fev. 2007.

WILLIAMS, T. et al. Induction of Effective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 88, n. 4, 23 mar. 2020.

- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 1 set. 2003.
- XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and biotransformation of pentachlorophenol by wood-decaying white rot fungus *Phlebia acanthocystis* TMIC34875. **Journal of Wood Science**, v. 66, n. 1, 2020.
- XIN, X. L. et al. Microbial transformation of acetyl-11-keto-boswellic acid by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 11, p. 1173–1178, 1 nov. 2013.
- XING, H. et al. Anti-Inflammatory ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon serra*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 10, p. 2844–2853, out. 2020.
- YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 129–165, 2006.
- ZANK, S. et al. Local health practices and the knowledge of medicinal plants in a Brazilian semi-arid region: Environmental benefits to human health. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 11, n. 1, p. 11, 23 fev. 2015.
- ZAWADZKA, K. et al. Carbazole hydroxylation by the filamentous fungi of the *Cunninghamella* species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19658–19666, 1 dez. 2015.
- ZHANG, Z. H.; HU, B. Q.; HU, G. Assessment of allelopathic potential of *Wedelia trilobata* on the germination, seedling growth and chlorophyll content of rape. **Advanced Materials Research**, v. 807–809, p. 719–722, 2013.
- ZHU, Y. et al. Metabolic characterization of pyrotinib in humans by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1033–1034, p. 117–127, 15 out. 2016.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.
- ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.