

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de derivados dos terpenos enidrina e afidicolina por
biotransformação e semi-síntese e avaliação da atividade
leishmanicida**

Marília Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

ALMEIDA, M. O. **Obtenção de derivados dos terpenos afidicolina e enidrina através de biotransformação e semi-síntese e avaliação da atividade leishmanicida.** 2010. 159f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Biotransformações são reações de compostos orgânicos realizadas por microrganismos, plantas ou enzimas isoladas. A transformação de um composto em particular pode ser realizada em grupos funcionais com ou sem degradação de seu esqueleto. Neste trabalho foram utilizados fungos endofíticos e de solo na biotransformação da lactona sesquiterpênica enidrina e do diterpeno afidicolina. A enidrina possui atividade antidiabética e anti-inflamatória. A afidicolina possui pronunciada atividade antitumoral, antiviral e leishmanicida. Foram realizados experimentos de biotransformação da enidrina e da afidicolina com os fungos endofíticos *Penicillium crustosum* VR4, *Papulospora immersa* SS13, *Fusarium oxysporium* SS50 e com o fungo de solo *Rhizopus stolonifer*. A biotransformação da enidrina com fungo endofítico *Papulospora immersa* SS13 levou à obtenção de um derivado di-hidroxilado, produzido pela abertura do epóxido presente no éster da cadeia lateral desta lactona sesquiterpênica. Este produto só havia sido previamente obtido na literatura por semi-síntese a partir da enidrina. Os experimentos de biotransformação da afidicolina não levaram ao isolamento e identificação de produtos. Reações semi-sintéticas com a afidicolina foram mais eficientes para a obtenção de derivados deste diterpeno. Foram obtidos cinco derivados semi-sintéticos da afidicolina: dois derivados mono-éteres de silício, um di-éter de silício, um derivado tetra-acetilado e um tri-acetilado. Ainda, na purificação dos produtos reacionais isolou-se o produto natural 3-desoxiafidicolina. Todos os derivados afidicolanos foram submetidos ao ensaio frente a *Leishmania major*. A afidicolina, a 3-desoxiafidicolina e a afidicolina tri-acetilada exibiram as atividades leishmanicidas mais significativas. Foram calculadas as lipofilicidades dos derivados afidicolanos. A maior atividade observada para o derivado tri-acetilado da afidicolina pode estar relacionada com sua maior capacidade de cruzar as membranas celulares. Este trabalho levou ao isolamento de um produto de biotransformação da enidrina e à identificação de novos derivados afidicolanos naturais e semi-sintéticos com atividade leishmanicida.

Palavras-chave: afidicolina, enidrina, biotransformação, semi-síntese, fungos endofíticos, *Leishmania major*.

ABSTRACT

ALMEIDA, M. O. **Obtainment of aphidicolin and enhydrin derivatives through biotransformation and semi-synthesis and evaluation of leishmanicidal activity.** 2010. 159f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Biotransformations are reactions of organic compounds made by intact microbial cells, plant cells or enzymes isolated. The transformation of a particular compound can be carried out at functional groups, with or without degradation of the carbonic skeleton. In this work endophytic and soil fungal strains were applied for the biotransformation of the bioactive terpenes enhydrin (sesquiterpene lactone) and aphidicolin (diterpene). Enhydrin shows anti-diabetic and anti-inflammatory activity. Aphidicolin has been reported as an antiviral, antitumoral and leishmanicidal hit. The endophytes *Penicillium crustosum* VR4, *Papulospora immersa* SS13, *Fusarium oxysporium* SS50 and the soil fungus *Rhizopus stolonifer* have been screened for the biotransformation of enhydrin and aphidicolin. The biotransformation of enhydrin, catalyzed by the endophytic *P. immersa* SS13, led to the isolation of a dihydroxy-derivative, a product of the sesquiterpene lactone side chain epoxide opening. This product had only been obtained previously by chemical means. The biotransformation experiments using aphidicolin as substrate were not successful in the production of derivatives. The derivatives of aphidicolin were more efficiently prepared through semi-synthetic approaches. Five aphidicolin semi-synthetic derivatives were obtained: two silicon mono-silyl ether derivatives, one silicon bis-silyl ether derivative, one tetra-acetylated derivative and one triacetylated derivative. During the purification of synthetic mixtures, the natural product 3-deoxyaphidicolin was also isolated. All the aphidicolane derivatives have been assayed against *Leishmania major*. Aphidicolin, 3-deoxyaphidicolin and triacetylated aphidicolin showed the higher leishmanicidal activities. The lipophilicities of aphidicolane derivatives were calculated. The higher activity presented by the triacetylated aphidicolin may be due to its higher ability to cross the cell membranes. This work led to the isolation of one biotransformation product of enhydrin and to the identification of new natural and semi-synthetic leishmanicidal aphidicolanes.

Key words: aphidicolin, enhydrin, biotransformation, semi-synthesis, endophytic fungi, *Leishmania major*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais como fármacos ou fonte de protótipos

Produtos naturais têm uma longa e bem sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos utilizados para sua sobrevivência. Como consequência do papel biológico para os organismos produtores, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicações biológicas (PUPO et al., 2006).

Entre todas as novas entidades químicas aprovadas como fármacos (1184) entre 1981-2006, 5% correspondem a produtos naturais, 47% correspondem a derivados semi-sintéticos de produtos naturais, mímicos de produtos naturais e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais, 18% são produtos biológicos e vacinas e 30% são produtos totalmente sintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Ganesan (2008) reavaliou os dados de Newman & Cragg (2007) através de aplicação de filtros para analisar as contribuições realmente originais de produtos naturais na terapêutica. Foram excluídos: os fármacos inspirados em produtos naturais descobertos antes de 1970, os derivados semi-sintéticos quando o produto natural só é usado como matéria prima e não contribuiu para a descoberta da atividade biológica (como exemplo os hormônios esteroidais), os fármacos mímicos de produtos naturais (baseados em ligantes endógenos), e, somente um fármaco foi considerado no caso de existirem dois ou mais produtos naturais de estruturas parecidas. Resultou desta forma num conjunto de 24 fármacos inovativos derivados de produtos naturais após 1970 e com aprovação no período de 1981-2006. Destes, 19 foram isolados de microrganismos (13 de actinobactérias, 2 bactérias e 4 de fungos) e 5 de plantas. Os fármacos derivados de produtos naturais de plantas foram taxol (anticancer), arglabina (anticancer), artemisinina (antimalárico), forskolina (bronco- e vasodilatador) e flaunotol (antiulcera). Os fármacos derivados de produtos naturais de bactérias foram ácido pseudomônico (antibacteriano) e spergualina (imunossupressor). Os fármacos derivados de produtos naturais de fungos foram compactina (hipolipêmico), echinocandina B (antifúngico), mizoribina (imunossopressor oral), ciclosporina A (imunossopressor). Entre os fármacos

derivados de actinobactérias estão midecamicina (antibiótico), cefamicina (antibiótico), tienamicina (antibiótico), SQ26,180 (antibiótico), daptomicina (antibiótico), coformicina (anticancer), bestatina (anticancer), calicheamicina (anticancer), rapamicina (imunossupressor), FK506 (imunossupressor), avermectina B1a (antiparasitário), lipstatina (anti-obesidade) e validamicina (antidiabético) (GANESAN, 2008) (Figura 1 p.3).

Harvey, em seu recente trabalho, relata que há mais de 100 novos compostos derivados de produtos naturais em fase de desenvolvimento clínico, sendo a maioria destes compostos isolados de plantas e microrganismos. Estes novos derivados de produtos naturais em fase de desenvolvimento clínico são especialmente anticancerígenos e anti-infectivos (HARVEY, 2008).

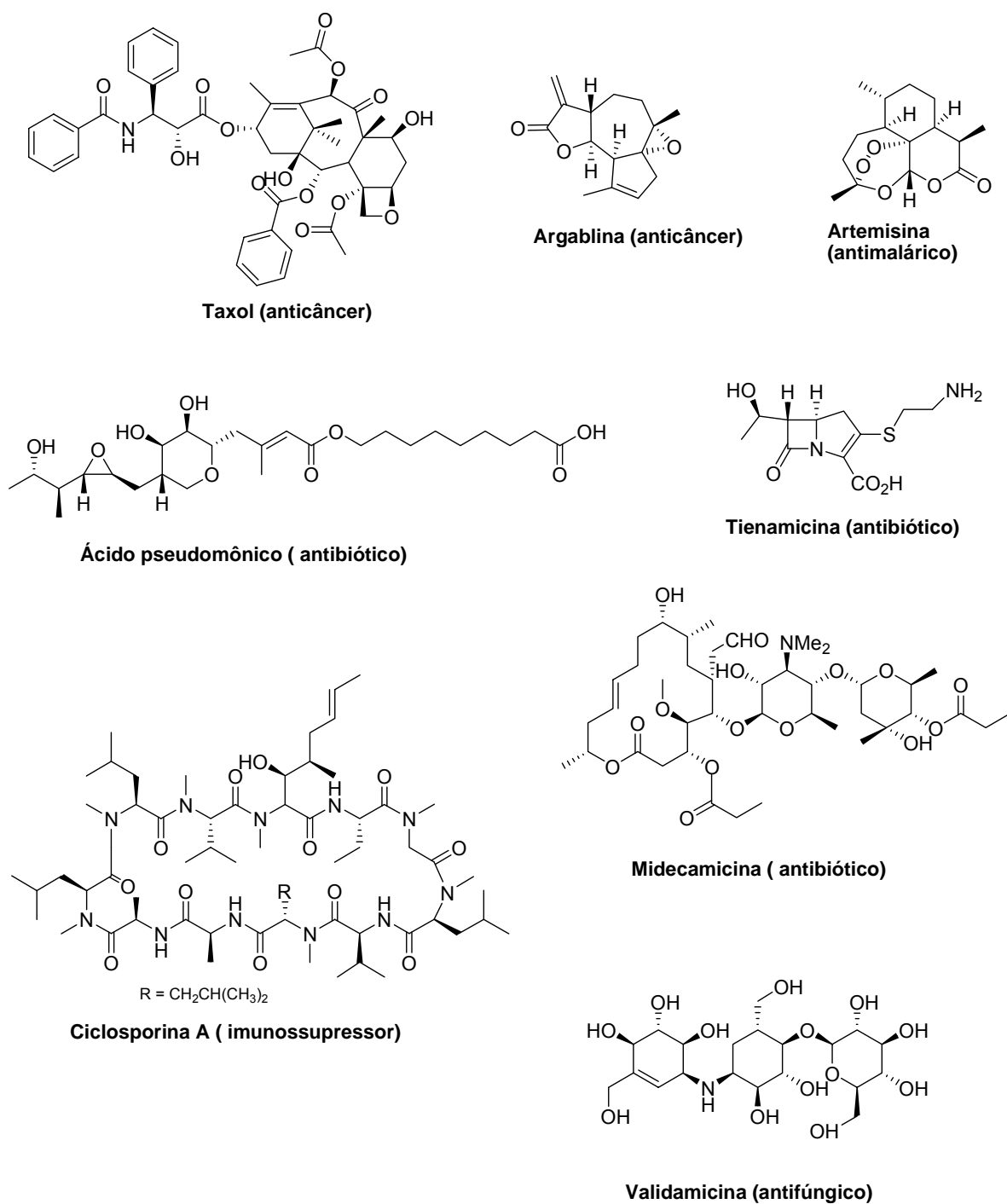


Figura 1. Alguns produtos naturais aprovados como fármacos (1970-2006).

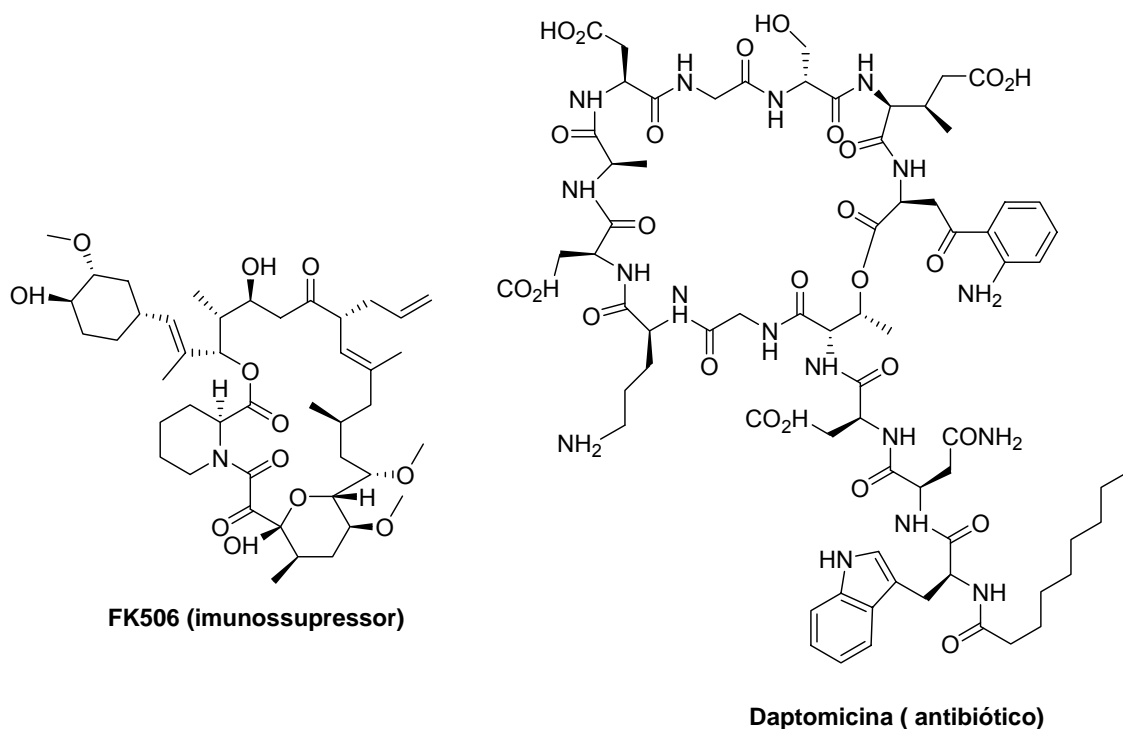


Figura 1. (Continuação da figura anterior). Alguns produtos naturais aprovados como fármacos (1970-2006).

1.2 Fungos endofíticos

Os fungos não são capazes de realizar fotossíntese por não produzirem clorofila, portanto são totalmente heterotróficos. Desta maneira, os fungos precisam adquirir seus nutrientes do meio ambiente e de organismos vivos, mortos ou em decomposição. Eles podem atacar diferentes hospedeiros de forma tão virulenta que podem ocasionar a morte destes hospedeiros e em seguida absorver os nutrientes liberados. Os fungos também podem desenvolver uma relação de simbiose com seu hospedeiro (BORGES et al., 2009b).

As interações mais comuns são as parasitárias e mutualísticas. Nas associações parasitárias o fungo vive no interior dos tecidos da planta, de onde obtém proteção e nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Neste caso, o metabolismo do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas à planta, o que pode levar a morte da planta (BORGES, 2008).

No caso das associações mutualísticas, a convivência entre o fungo e a planta é pacífica, uma vez que os dois organismos sobrevivem assintomaticamente à associação, ambos sendo beneficiados. O fungo recebe nutrição e abrigo da

planta hospedeira, aumentando a sua sobrevivência, e a planta aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho de seu hospedeiro é a excreção de metabólitos (SCHULZ et al., 1995). Este é o caso do mutualismo defensivo, pois o fungo protegendo a planta está protegendo a si próprio (CLAY, 1988) sugerindo uma adaptação recíproca que vem de longa data.

A maioria, ou senão todas as plantas estudadas no ecossistema natural, são infestadas por fungos sem nenhuma manifestação externa de doença. Estes fungos são chamados de endofíticos e são diversos (BORGES et al., 2009b). O microrganismo que habite todo, ou pelo menos um período de seu ciclo de vida, o interior de uma planta hospedeira e não lhe cause doenças ou sintomas aparentes pode ser considerado endofítico (BORGES, 2008).

A mais recente definição descreve como endofítico microrganismos que podem ser detectados em um momento particular em tecidos de plantas aparentemente saudáveis, descartando o futuro status da relação. A colonização pode ser inter ou intracelular, localizada em um tecido ou generalizada (SCHULZ; BOYLE, 2005). Por definição, estes fungos são conhecidos como endofíticos e ocorrem em grande diversidade no interior de seus hospedeiros (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

O que gera controvérsias no termo é a dificuldade de distinguir os limites dos termos endofítico, epifítico (referindo a microrganismos que vivem na superfície de plantas) e fitopatógenos (microrganismos que causam doenças às plantas). Existem vários relatos nos quais os endofíticos podem se tornar parasitas sob determinadas condições (SCHULZ; BOYLE, 2005). Apesar disto, um grande número de publicações ainda está baseada no conhecimento convencional de que os fungos endofíticos são defensores mutualísticos das plantas (SALMINEN et al., 2005; GRAYER; KOKUBUN, 2001).

A relação entre endofítico-hospedeiro é expressa pelo balanço antagônico entre a virulência do endofítico e a resposta de defesa da planta. Esta relação é de um balanço dinâmico e pode sofrer mudanças sob condições de estresse do hospedeiro, ou mudanças fisiológicas de um dos organismos envolvidos. Se este balanço é alterado, o hospedeiro pode desenvolver uma condição de doença. Como consequência dessa interação, os metabólitos secundários podem ser importantes

na sinalização, defesa, e regulação desta relação simbiótica e, além disso, favorecer a biossíntese de um novo metabólito bioativo (BORGES et al., 2009b).

Como resultado da estreita relação dos microrganismos endofíticos e seus hospedeiros, há possibilidade de que alguns microrganismos endofíticos tenham sistemas genéticos que permitam a transferência de informações entre eles próprios e a planta hospedeira (GALLO et al., 2007). Como consequência, os microrganismos associados podem alterar rotas bioquímicas para comandar a produção de substâncias comuns a seus hospedeiros ou vice-versa, que podem ter aplicações fora da planta hospedeira na qual eles normalmente residem (STROBEL, 2002).

De fato, o estudo dos produtos naturais de plantas e seus hospedeiros mostra a possibilidade dessa hipótese de endofíticos produzirem os mesmos metabólitos aos que suas plantas hospedeiras produzem. E alguns fármacos importantes têm sido identificados de fungos endofíticos. O potente fármaco anti-câncer paclitaxel (Taxol), produzido por *Taxus brevifolia*, foi isolado do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*. A vincristina, um agente potente contra leucemia, foi produzida por fungos endofíticos das folhas de *Catharantus roseus*. O endofítico isolado de *Nothapodytes foetida* (Icacinácea), *Entrophora infrequens*, foi capaz de produzir a camptotecina, um agente quimioterapêutico eficiente contra o câncer de útero e ovário, isolado pela primeira vez da *Camptotheca acuminata* (Figura 2 p. 7) (PUPO et al., 2006).

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma geração à outra do vegetal. A grande maioria destes fungos parece ser transmitida horizontalmente, por esporos, diferentemente dos fungos que são transmitidos verticalmente através de sementes de seu hospedeiro ou propágulos vegetativos. Os endofíticos podem estar em todos órgãos de uma planta hospedeira, possuindo exoenzimas necessárias para colonizar seus hospedeiros, mas usualmente habitam as partes superiores de plantas como folhas, galhos, cascas, pecíolo e estrutura reprodutiva (BORGES, 2008).

Em adição, diversas moléculas produzidas pelos fungos endofíticos, incluindo alcalóides, terpenos, isocumarinas, quinonas, flavonóides, peptídeos e compostos orgânicos voláteis, apresentam muitas atividades biológicas (PUPO et al., 2006), demonstrando a capacidade destes microrganismos, ainda relativamente pouco explorados, como produtores de moléculas bioativas e potencial de desenvolvimento de novos fármacos.

Em um recente artigo, Borges e co-autores relataram 217 metabólitos produzidos por fungos endofíticos entre 2006-2008, incluindo diversas atividades biológicas, bem como substâncias novas cujas atividades biológicas ainda não foram averiguadas (BORGES et al., 2009b).

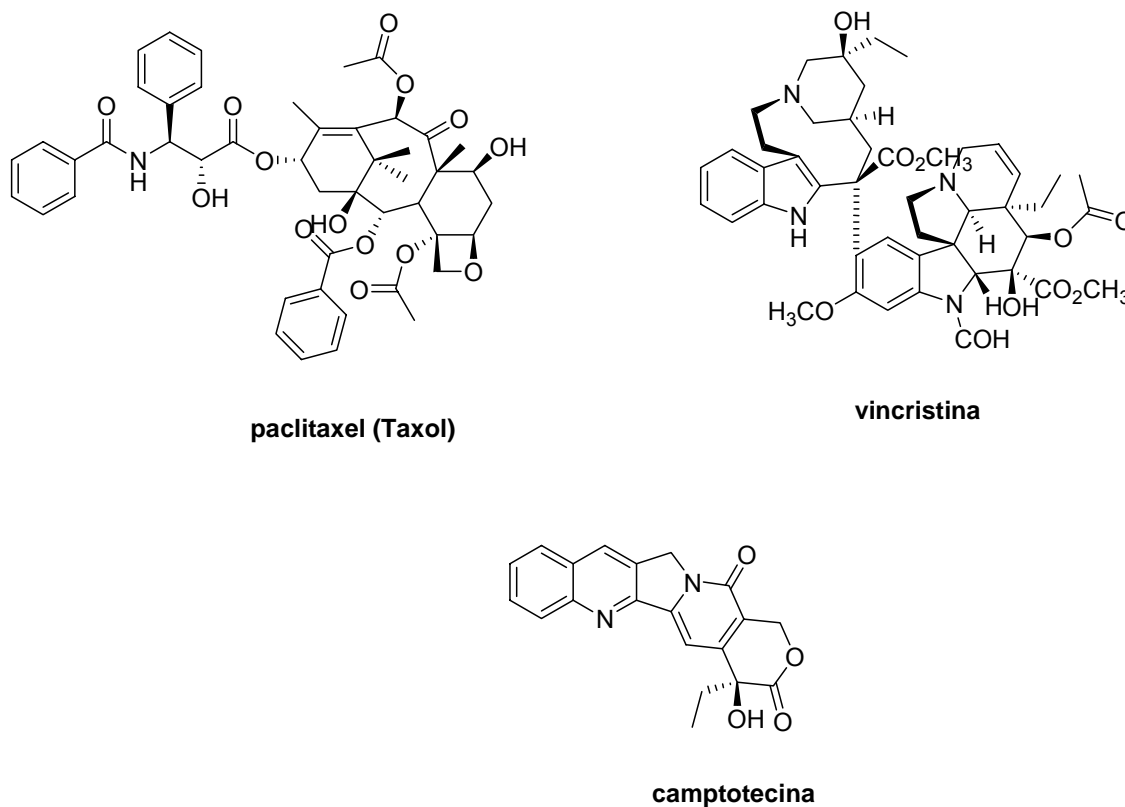


Figura 2. Metabólitos anticancerígenos de plantas hospedeiras encontrados nas culturas de fungos endofíticos.

1.3 Estratégias de modificação estrutural

1.3.1 Biotransformação

O desenvolvimento de novos métodos biocatalíticos é uma área de contínuo crescimento na química, microbiologia e engenharia genética devido ao fato de que biocatalisadores são seletivos, fáceis de manusear, e ambientalmente amigáveis. Uma vasta gama de reações é catalisada por microrganismos. A transformação de um composto pode ser realizada em grupos funcionais com ou sem degradação de seu esqueleto. Estas modificações resultam na formação de novas estruturas e

compostos que são difíceis ou impossíveis de serem obtidos através da química convencional (BORGES et al., 2009a).

As biotransformações empregando microrganismos, ou seja, células integras, como bactérias, leveduras e fungos, apresentam vantagens em relação ao uso de enzimas isoladas, pois os microrganismos apresentam rápido crescimento e fácil formação do sistema multienzimático, além de facilidade de desenvolvimento experimental e possibilidade de reutilização das células microbianas (FABER, 2004).

Fungos são capazes de catalisar um amplo espectro de reações químicas. Eles também exibem alta tolerância a uma diversa variedade de substâncias químicas. Os fungos podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes da molécula. Podem realizar reações em regiões que dificilmente se obteriam por síntese química, isto é, funcionalização de posições não ativadas em moléculas orgânicas, tal como hidroxilações em cadeias alifáticas (BORGES, et al., 2009a). O sistema de biotransformação de fungos envolve principalmente as seguintes enzimas (FABER, 2004):

- Oxidorredutases- catalisam reações de oxidação e redução em ligações C-H, C-C, C=C, além de oxidações em heteroátomos como N e S;
- Transferases- transferem grupamentos aldeídicos, cetônicos, acílicos, açúcares, fosforílicos e metílicos;
- Hidrolases- hidrolisam ou formam ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos;
- Liases- promovem adição ou eliminação de pequenas moléculas em ligações C=C, C=N, C=O;
- Isomerases- promovem isomerizações como racemização, epimerização, rearranjos;
- Ligases- formam e quebram ligações C-O, C-S, C-N com concomitante quebra do trifosfato.

As biotransformações, devido à natureza quirais das enzimas, podem ser quimio-régio-, diastereo- e enantiosseletivas, levando à produção de compostos quirais à partir de misturas racêmicas (BORGES et al., 2007). Adicionalmente, diversas destas reações são muito semelhantes ao que acontece nas reações do metabolismo de xenobióticos em mamíferos, portanto estes modelos *in vitro* podem

ser uma atrativa alternativa para testes de metabolismo de novos fármacos, contribuindo para estudos farmacocinéticos de ADME (administração, distribuição, metabolismo e excreção) (AZERAD, 1998).

Estudos de biotransformação de produtos naturais realizados por cepas fúngicas têm sido descritos na literatura como estratégia para obtenção de derivados com maior atividade biológica, menor toxicidade, com propriedades farmacocinéticas melhoradas ou, ainda, para aumentar a diversidade química através da obtenção de novas estruturas (BORGES et al., 2009a).

Resibufogenina, cinobufagina e bufalina são esteróides, isolados do fármaco Chinês Chan'su. Estes compostos exibiram significativa atividade citotóxica frente a células humanas cancerígenas. A biotransformação destes bufadienólídeos por *Nocardia sp.* foi investigada. A biotransformação da resibufogenina (**B.M.C.L.1**) resultou em dois produtos **B.M.C.L.(2-3)**, sendo o composto **B.M.C.L.3**, derivado hidroxilado, de maior citotoxicidade que os outros bufadienólídeos. No composto **B.M.C.L.3** ocorre a clivagem do grupo 14 β , 15 β epóxido e regioseletiva acetoxilação. O composto **B.M.C.L.4**, cinobufagina, em sua biotransformação produziu o composto **B.M.C.L.5**, derivado acetilado. A biotransformação do composto **B.M.C.L.6**, bufalina, produziu somente o composto **B.M.C.L.7**, derivado acetilado. Os compostos acetilados **B.M.C.L.5** e **B.M.C.L.7** mostraram menor citotoxicidade que seus substratos (ZHANG, et al., 2007).

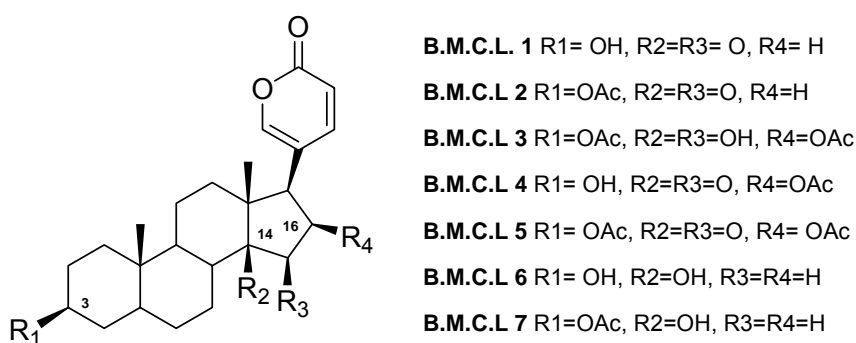


Figura 3. Biotransformação dos esteróides Resibufogenina (**B.M.C.L.1**), cinobufagina, (**B.M.C.L.4**), e de bufalina (**B.M.C.L.6**) por *Nocardia sp.*

Em outro recente trabalho foi descrito a transformação microbiana de dois derivados de ent-pimara-9(11),15-dienos pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. O composto **J.N.P.4** em sua biotransformação produziu os compostos **J.N.P.6**, **J.N.P.7**, **J.N.P.9** e

J.N.P.11. A biotransformação do composto **J.N.P.5** produziu os metabólitos **J.N.P.(13-16)**. Nestas biotransformações a principal reação foi de epoxidação da dupla ligação dos carbonos C-9 e C-11, seguida pelo rearranjo de álcoois alílicos (FRAGA, et al., 2009).

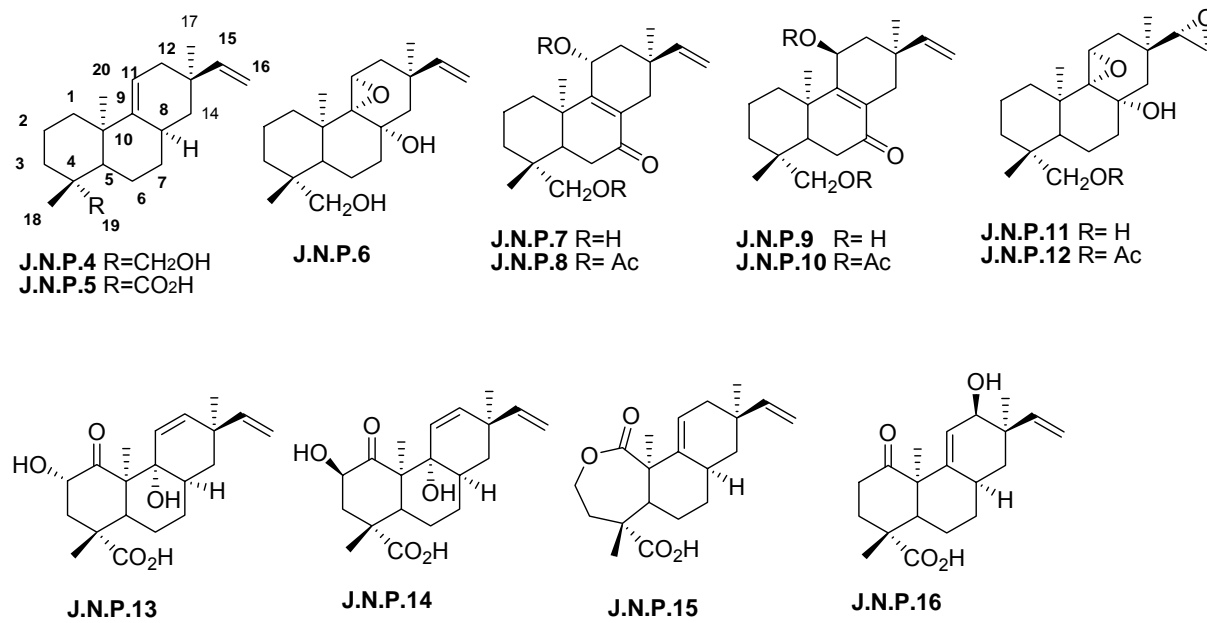


Figura 4. Biotransformação dos derivados de ent-pimara-9(11),15-dienos, **J.N.P.4** e **J.N.P.5** pelo fungo *Gibberella fujikuroi*

Enquanto os relatos sobre os metabólitos produzidos por endofíticos têm aumentado significativamente na literatura, os trabalhos sobre a utilização dos endofíticos em experimentos de biotransformação ainda são poucos (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008; BORGES, 2008; BORGES, et al., 2009a; BORGES, et al., 2009b).

Um recente trabalho mostrou a biotransformação da lignana tetraidrofurânica, (-)-grandisina, **J.B.C.S.6**, pelo fungo endofítico *Phomopsis sp.*, obtido de *Vigueira arenaria*. O produto de biotransformação, 3,4-dimetil-2-(4-hidróxi-3,5-dimetóxi-fenil)-5-metóxi-tetraidrofurano, **J.B.C.S.10**, mostrou atividade tripanocida frente ao parasita *Trypanosoma cruzi* (VERZA et al., 2009).

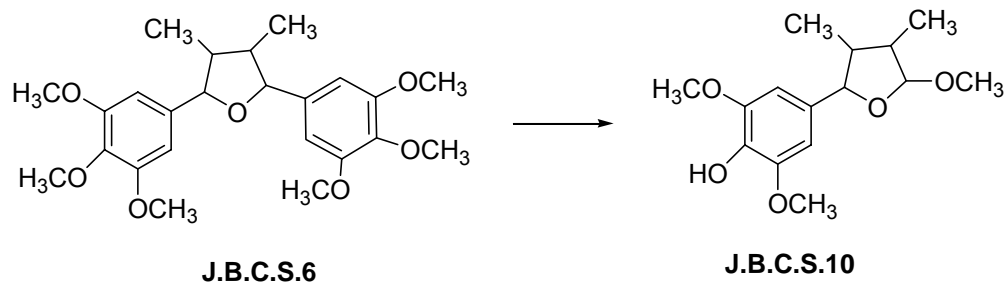


Figura 5. Biotransformação da lignana tetraidrofurânica, (-)grandisina, **J.B.C.S.6**, pelo fungo endofítico *Phomopsis sp.*

Estudos de biotransformação de fármacos também são importantes, pois podem gerar metabólitos ativos ou intermediários de síntese com interesse industrial (BORGES, 2008).

Recentemente, o grupo de pesquisa em química de microrganismos sob coordenação da professora Mônica T. Pupo e em colaboração com da professora Pierina S. Bonato, da FCFRP-USP, mostrou a biotransformação oxidativa do fármaco neuroléptico tioridazina (THD), catalisada de forma estereosseletiva aos sulfóxidos quirais por linhagens de endofíticos, em diferentes proporções e rendimentos (BORGES et al., 2007; BORGES et al., 2008). A biotransformação estereosseletiva da tioridazina foi estudada utilizando 12 fungos endofíticos isolados de *Tithonia diversifolia*, *Viguiera robusta* e *V. arenaria*. Em geral, o enxofre da cadeia lateral (posição 2) ou enxofre do anel fenotiazínico foram oxidados produzindo os principais metabólitos do metabolismo humano da tioridazina, tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-5-sulfóxido. Tioridazina 2-sulfóxido e tioridazina 2-sulfona são metabólitos considerados farmacologicamente ativos enquanto a tioridazina 5-sulfóxido contribui para os efeitos cardiotoxicos do fármaco. Assim, estudos do metabolismo da tioridazina por fungos endofíticos podem ser úteis para obter metabólitos em sua forma enantiomericamente pura e depois estudar seus efeitos clínicos e tóxicos (BORGES, 2008).

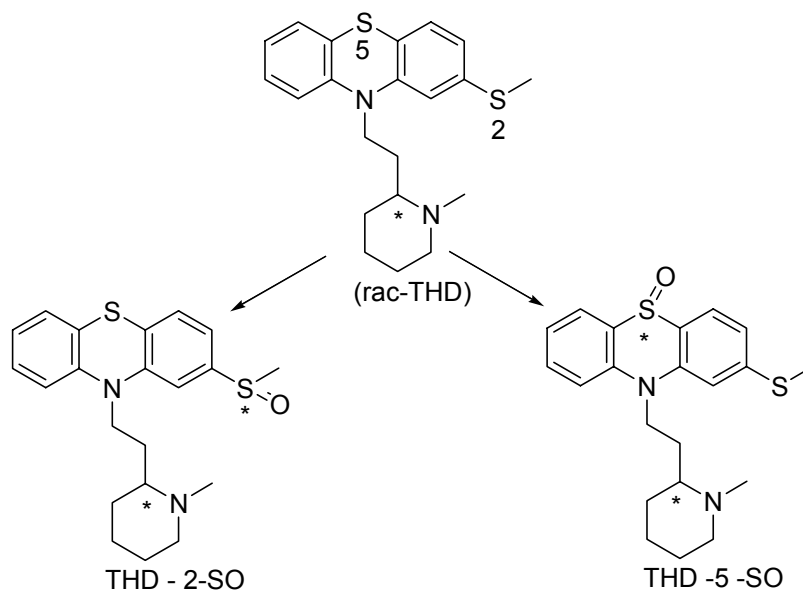


Figura 6. Biotransformação oxidativa do fármaco neuroléptico tioridazina (THD)

Em um recente trabalho de Borges e colaboradores foram relatadas diversas reações de biotransformação estereosseletivas mediadas por fungos, como hidroxilação estereosseletiva, sulfoxidação, epoxidação, oxidação de Baeyer-Villiger, deracemização e redução de cetonas estereo e enantiosseletiva, publicadas entre 2000 e 2007 (BORGES et al., 2009a).

1.3.2 Produtos naturais semi-sintéticos

Os produtos naturais apresentam uma complexa diversidade química acompanhada de uma extensa complexidade estereoquímica (PUPO et al., 2007). A originalidade de muitas estruturas de produtos naturais atrai a atenção para seu uso como ponto de partida para semi-síntese e síntese total (BUTLER, 2005).

Modificações de produtos naturais através da semi-síntese levaram a produtos obtidos por combinações de diversos tipos de modificações. O antibacteriano meticilina é obtido através de modificações semi-sintética da penicillina G, estrutura de maior estabilidade. A telitromicina é um antibacteriano com modificações semi-sintéticas da eritromicina. Mesmo classes de antibióticos intensamente exploradas no passado ainda oferecem excelente perspectivas, como no caso da tigeciclina. A tigeciclina é um antibacteriano derivado semi-sintético da tetraciclina ou minociclina, e apresenta uma ligação ao ribossomo bacteriano bem

mais forte que tetraciclina, sendo assim ativa contra bactérias resistentes a esses antimicrobianos (Figura 7 p.14) (NUSSBAUM et al., 2006).

Recentes avanços no desenvolvimento de quimioterápicos de origem sintética e o descobrimento de novos antibióticos potentes isolados de fontes naturais representam contribuições inestimáveis na luta contra a resistência bacteriana. Derivados semi-sintéticos da vancomicina e teicoplanina contendo substituintes hidrofóbicos na porção do carboidrato mostraram-se ativos contra linhagens bacterianas resistentes à vancomicina. O mais notável entre estes é a oritavancina (Figura 7 p.14), que já está no mercado, contendo o grupo (*p*-clorofenil) benzil ligado na porção carboidrato, e possui elevada atividade bacteriana frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MRSA e *Enterococcus* resistente a vancomicina VRE, além de outras bactérias Gram-positivas. De modo similar, o glicopeptídeo telavancina, um derivado da vancomicina, tem apresentado atividade potente contra linhagens resistentes (NUSSBAUM et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

A maioria dos fármacos antifúngicos tem conexão com os produtos naturais. As equinocandinas atuam inibindo na parede celular dos fungos. Os antifúngicos equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) têm sido bastante úteis no tratamento de infecções fúngicas apresentando menores efeitos colaterais que a anfotericina B. Caspofungina e micafungina (Figura 7 p.14) são derivados semi-sintéticos já disponíveis no mercado (HARVEY, 2008).

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de DAC (doença coronariana arterial). Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. No momento, seis estatinas são empregadas clinicamente: lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), sinvastatina (Zocor), derivado semi-sintético, e fluvastatina (Lescol) (Figura 7 p.14), primeiro agente totalmente sintético, derivado de mevalonolactona produzido na forma racêmica. A nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, é representada por atorvastatina (Lipitor) e rosuvastatina (Crestor) (CAMPO; CARVALHO, 2007).

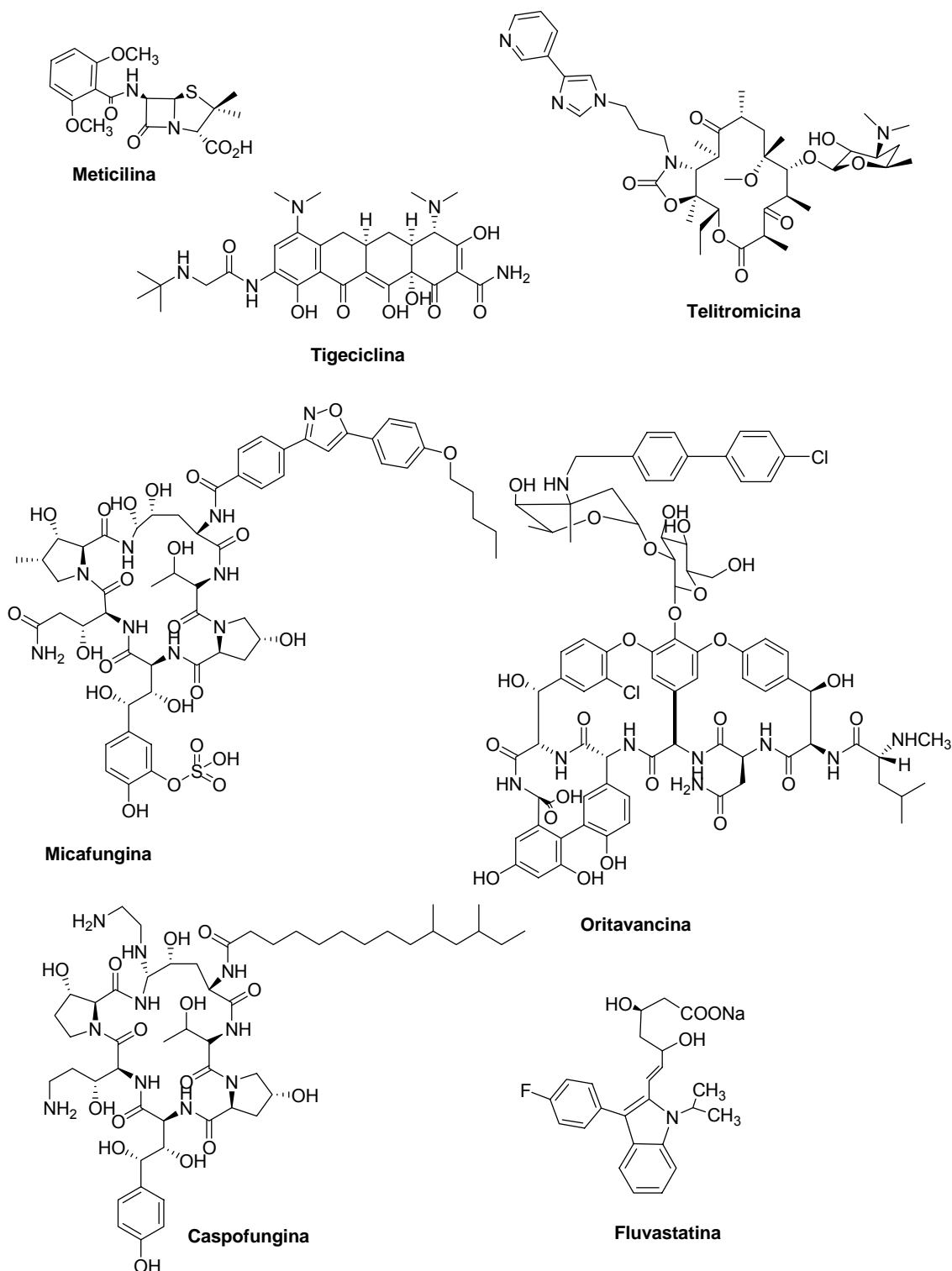


Figura 7. Derivados semi-sintéticos e sintéticos de produtos naturais

Uma estratégia de modificação molecular utilizada pelos químicos medicinais, para otimização de um composto protótipo é o bioisosterismo. O bioisómero é um composto resultante da troca isostérica de átomos ou subunidades estruturais, por outros átomos ou subunidades estruturais, similares em distribuições eletrônicas, volumes moleculares ou propriedades físico-químicas, capazes de apresentarem propriedades biológicas similares ao composto original. As propriedades biológicas similares referem-se ao reconhecimento pelo mesmo biorreceptor, podendo ser agonista ou antagonista (BARREIRO, 2001; LIMA; BARREIRO, 2005.). O bioisosterismo é classificado e dividido em duas classes: o bioisosterismo clássico e o bioisosterismo não-clássico. No bioisosterismo clássico empregam-se os grupos de similaridades eletrônicas e estéricas monovalentes (CH₃, NH₂, OH, F), divalentes (CH₂, NH, O, S, Se, Te), trivalentes (CH, N, P, Sb) e tetravalentes (C, Si,) e anéis equivalentes. Os bioisómeros não clássicos não seguem as mesmas regras eletrônicas e estéricas dos bioisómeros clássicos, mas produzem atividades biológicas similares (BARREIRO, 2001; LIMA; BARREIRO, 2005).

O bioisosterismo é empregado na modificação racional e otimização de um composto protótipo com a finalidade de melhorar as propriedades farmacocinéticas, melhorar a afinidade, eficácia e especificidade por um determinado receptor e eliminação de efeitos adversos (LIMA; BARREIRO, 2005). Muitos fármacos de diferentes classes terapêuticas são bioisómeros como no caso dos antibacterianos sulfadiazina (**C.M.C.52**) e o sulfametoxazola (**C.M.C.53**), no caso dos analgésicos o ABT-418 (**C.M.C.57**) e nicotina (**C.M.C.56**), e os fármacos pra disfunção erétil vardenafila, o levitra (**C.M.C.61**) e o sildenafil, o Viagra (**C.M.C.60**) (Figura 8 p.16) (LIMA; BARREIRO, 2005).

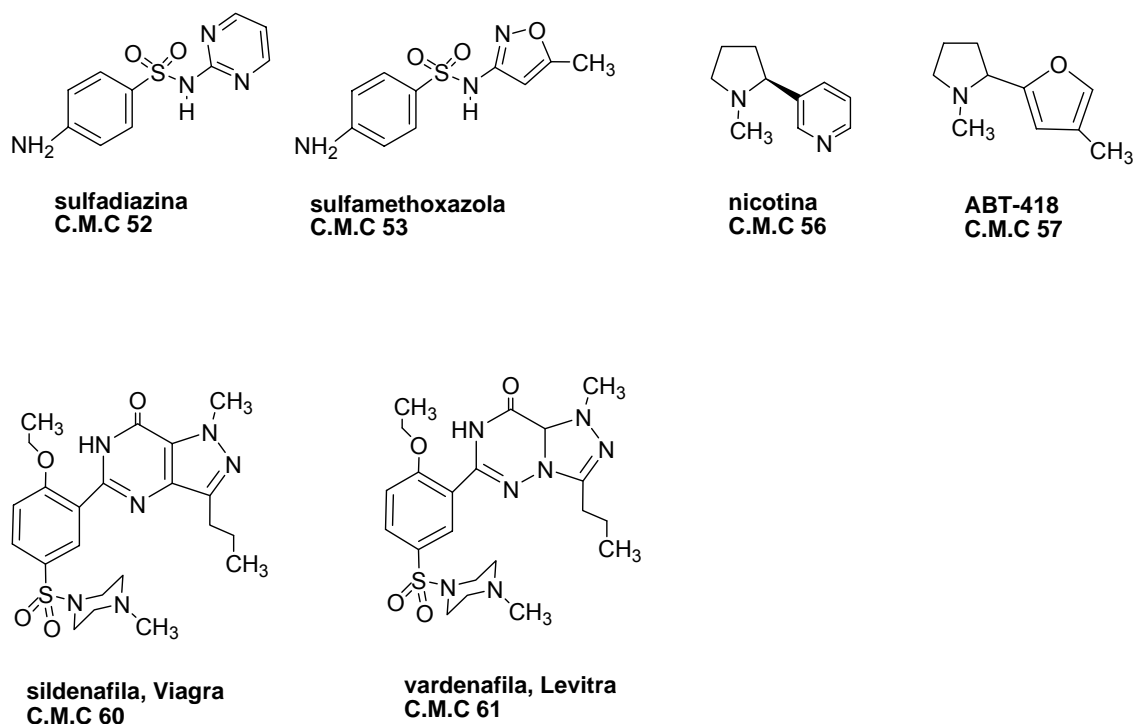
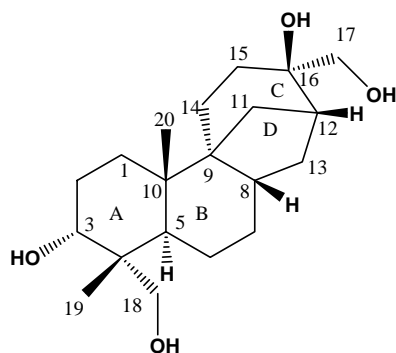


Figura 8. Exemplos de fármacos bioisómeros de diferentes classes terapêuticas

1.4 Afidicolina

A afidicolina é um diterpeno caracterizado pelo esqueleto biciclooctano nos anéis C/D, e foi isolado pela primeira vez das culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola* em 1972 (BRUNDRET; HESP; DALZIEL, 1972).



Afidicolina

O estudo de fungos endofíticos, associados com *Smallanthus sonchifolius*, levou ao isolamento de 32 fungos que foram cultivados e produziu-se 186 extratos, sendo 12% com atividade citotóxica alta e considerados promissores compostos anticancerígenos. Entre esses fungos, destacou-se *Nigrospora sphaerica* (SS67), isolado do caule e raiz do yacon, que produziu afidicolina, nos cultivos em meio

líquido e sólido de arroz, como componente majoritário destes extratos. A excelente atividade da afidicolina foi confirmada frente a quatro linhagens de células cancerígenas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (colon), SF295 (cérebro) e HL-60 (leucemia promielocítica) (GALLO et al., 2009). Diversos estudos biológicos prévios demonstraram a atividade deste diterpeno contra vírus de DNA e diversas linhagens de células tumorais, sem toxicidade para as células humanas (BUCKNALL et al., 1973; SPADARI et al., 1985).

A afidicolina despontou como um potencial candidato a fármaco antineoplásico e antiviral. Entretanto, a afidicolina sofre rápida desativação *in vivo* através da ação de oxidase microsomal hepática, limitando seu potencial clínico (SPADARI et al., 1985). O principal produto de metabolização envolve a oxidação do álcool em C-3 ao derivado cetônico, inativo. Diversos estudos sintéticos foram realizados para a obtenção de análogos da afidicolina. Uma série de derivados foi obtida e os resultados parecem indicar a importância dos grupamentos hidroxílicos em C-3 e C-16 para a atividade citotóxica (RIZZO; SMITH III, 1991).

A atividade leishmanicida foi também relatada para afidicolina e seus derivados semi-sintéticos (KAYSER et al., 2001). Neste trabalho todos compostos semi-sintéticos derivados da afidicolina foram testados contra espécies intracelulares e extracelulares de *Leishmania*. Anfotericina B e miltefosina foram usados como fármacos para o controle positivo. A atividade leishmanicida foi expressa como 50% de concentração efetiva, (EC_{50} s), como a concentração de um composto a qual causa 50% de redução na sobrevivência em comparação a culturas idênticas sem o composto. Assim os compostos **A.A.C.6**, **A.A.C.5**, **A.A.C.14** e **A.A.C.18** (Figura 9 p.18) apresentaram maior atividade relativa maior toxicidade para o parasita intracelular *L. major* com DL_{50} s de 0.16 μ M, 0.19 μ M, 0.33 μ M, e 0.30 μ M, respectivamente (KAYSER et al., 2001).

Os afidicolanos são de toxicidade moderada para células de mamíferos. É interessante destacar que o produto da metabolização *in vivo* da afidicolina, o derivado cetônico 3 oxo-afidicolina, com a baixa atividade citotóxica mantém a atividade leishmanicida (KAYSER et al., 2001).

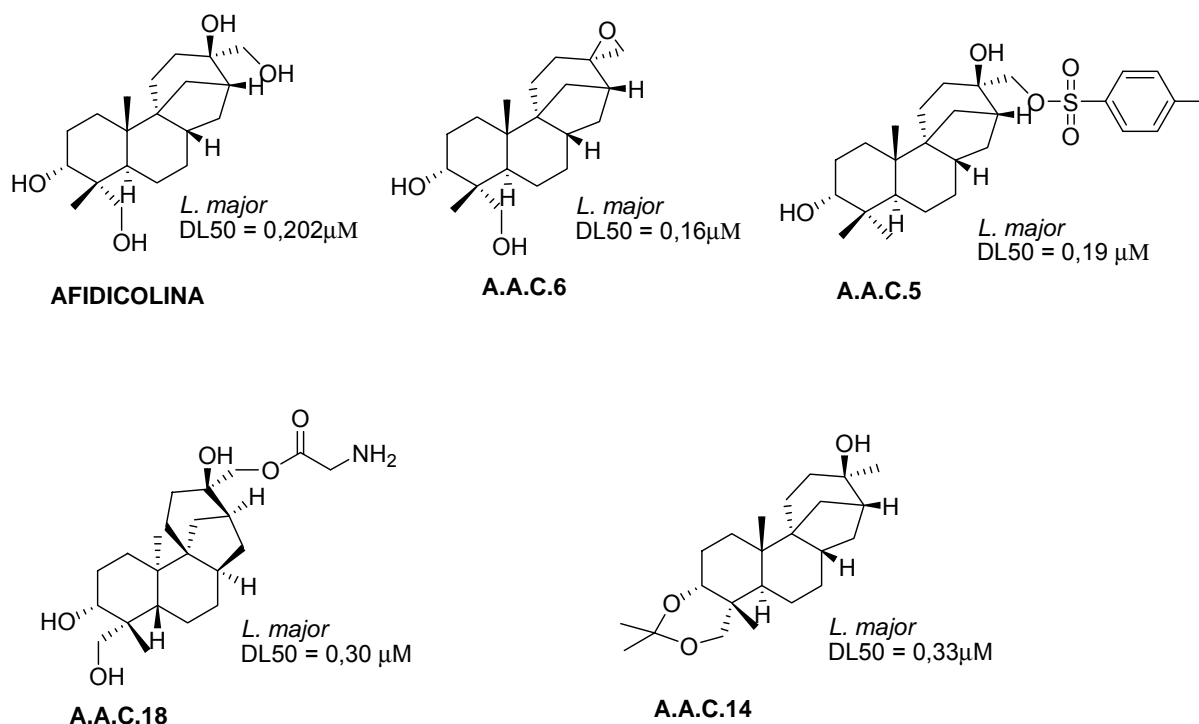


Figura 9. Compostos derivados semi-sintéticos da afidicolina e suas respectivas atividades leishmanicidas frente a *L. major*

1.5 Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. A infecção se estabelece nas células do sistema fagocítico mononuclear determinando as formas clínicas tegumentar e visceral (GOTO, 2004). Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2007). No Brasil, tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral são endêmicas. A prevalência elevada, dificuldades de intervenção no ciclo de transmissão e a repercussão sócio-econômica fazem das leishmanioses um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo (GOTO, 2004).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa que acomete a pele e mucosas. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2007). A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. No Brasil a leishmaniose

tegumentar ocorre em praticamente em todo território, estando em plena expansão. Na década de 80, a LTA foi assinalada em 19 estados verificando sua expansão geográfica. Em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2007).

A leishmaniose visceral caracteriza-se por proliferação de parasitos principalmente no baço, fígado e medula óssea, mas pode determinar lesões em praticamente todos os órgãos (GOTO, 2004). Dada a sua alta incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neo-tropical. No Brasil sua maior incidência ocorre no nordeste (aproximadamente 90%). Contudo, à medida que a doença se expande para outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas a situação vem se modificando e no período de 2000 a 2002 a região nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do país (BRASIL, 2007).

O modo de transmissão da leishmaniose é através de picadas de insetos transmissores infectados e não há transmissão de pessoa pra pessoa (BRASIL, 2007). Durante o ciclo biológico, os parasitas apresentam-se sob duas formas morfológicamente distintas. No hospedeiro vertebrado, no interior de macrófagos, comportando-se com parasita intracelular obrigatório, encontram-se as formas amastigotas, arredondadas e sem flagelo. Estas formas transformam-se em formas promastigotas, no tubo digestivo do inseto vetor, alongada com flagelo externo, que evoluem para forma metacíclica, que é altamente infectiva. Os vetores são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. A transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor infectado que inocula promastigotas no hospedeiro. Estas são fagocitadas por macrófagos dos órgãos do sistema fagocítico mononuclear, transformam-se em amastigotas e proliferam-se desencadeando o processo patológico no hospedeiro (GOTO, 2004; MISHRA et al., 2009).

Já foram registrados como hospedeiros vertebrados e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres

e primatas inclusive o homem. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos (BRASIL, 2007). A participação de animais silvestres e insetos no ciclo do parasito nas matas e florestas dificultam qualquer intervenção para o controle da transmissão, e mesmo na parte envolvendo cães o controle não tem sido possível devido à ocorrência da epidemia em áreas urbanas com densidade populacional alta (GOTO, 2004).

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses possui limitações como custo elevado, dificuldades na administração, toxicidade e, devido mais importante que é a resistência do parasito. O desenvolvimento da resistência representa um obstáculo importante no sucesso do tratamento da doença (MISHRA et al., 2009).

Dentre os fármacos agentes quimioterápicos em uso no tratamento de leishmanioses estão os antimoniais pentavalentes. Estibogluconato de sódio (Pentosam) e antimoniato de meglumina (Glucantime) têm sido os mais usados na terapia da leishmania visceral. O mecanismo de ação dos antimoniais é a interferência no processo bioenergético das formas amastigotas. Estes compostos ligam e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas na glicólise e oxidação dos ácidos graxos. As pentadiminas atuam sobre o genoma do patógeno, dificultando a replicação e transcrição no nível mitocondrial. O antibiótico anfotericina B agora está sendo o mais amplamente utilizado na terapia da leishmania visceral. A anfotericina atua ligando-se e alterando especificamente aos esteróis da membrana celular (ergosterol) do parasita (MISHRA et al., 2009, MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007).

Um fármaco em fase clínica é a miltefosina, desenvolvido inicialmente como antitumoral, sendo um excelente composto leishmanicida. Seu mecanismo de ação ainda não está completamente definido, mas sabe-se que atua no metabolismo lipídico da membrana parasitária. A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que atualmente se encontra em fase de desenvolvimento avançado para o tratamento da leishmaniose visceral. A paromomicina atua em sinergia com os antinomiais *in vitro*, e a combinação tem sido efetiva na Índia. Os aminoglicosídeos atuam prejudicando a síntese de macromoléculas e alteram as propriedades de membrana dos parasitas. A sitamaquina ou kalazaquina é uma aminoquinolina cujo desenvolvimento clínico tem sido lento. Parece ser responsável por alteração da

morfologia do parasita e alvos intracelulares identificados são mitocôndrias e alcidocalcisomes (MISHRA et al., 2009, MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007).

Recentes pesquisas relatam que os produtos naturais têm sido considerados como potenciais fontes de novos agentes para o tratamento de leishmaniose, onde muitos alcalóides apresentaram excelentes atividades leishmanicidas (MISHRA et al., 2009). Os alcalóides quinolínicos **F.6**, **F.7** e **F.8** (Figura 10 p.22), isolados de *Galipea longiflora* Krause (*Rustaceae*) mostraram atividade *in vitro* a promastigotas de *L. braziliensis*, com IC₉₀ de 50, 25 e 25 µg/mL respectivamente. O alcalóide isoquinolínico **F.18** (Figura 10 p.22), isolado de várias famílias (*Annonaceae*, *Menispermaceae*, *Berberifaceae*) exibiu a maior atividade leishmanicida frente *L. major* com IC₅₀ = 10 µg/mL em ratos. O metabólito **F.56** (Figura 10 p.22), isolado da esponja marinha *Haliclona exígua*, mostrou atividade leishmanicida a 100 µg/mL frente a promastigotas (MISHRA et al., 2009).

O antifúngico, anigorufona, fenilfenalona, uma fitoalexina isolada de uma bananeira (*Musa acuminata*) é produzido na planta quando está em contato com fungo patogênico *Fusarium oxysporum*. Foram testados a anigorufona, outra fitoalexina de mesma origem (**REF20**), o derivado metoxi da anigorufona (**REF5**), e foram testados também dois epóxidos (**EP5**) e (**EP6**), precursores de síntese química da anigorufona (Figura 10 p.22). Estes compostos foram testados frente à promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *L. infantum*. Todos estes compostos mostraram atividade leishmanicida (LUQUE-ORTEGA et al., 2004).

Cochlioquinona A (**P.L.O.S.1**) e isocochlioquinona A (**P.L.O.S.2**) (Figura 10 p.22), são metabólitos isolados do fungo endofítico *Cochliobolus* sp., isolados da planta *Piptadenia adiantoides*, e mostraram atividade leishmanicida. Ambos compostos cochlioquinona A e isocochlioquinona A foram ativos frente a *L. amazonensis* com valores de EC₅₀ de 1.7 µM e de 4.1 µM, respectivamente. Estes compostos não exibiram atividade frente a três tipos de células cancerígenas MCF-7 (mama), TK-10 (renal), e UACC-62 (melanoma) indicando algum grau de seletividade para o parasita (CAMPOS et al., 2008).

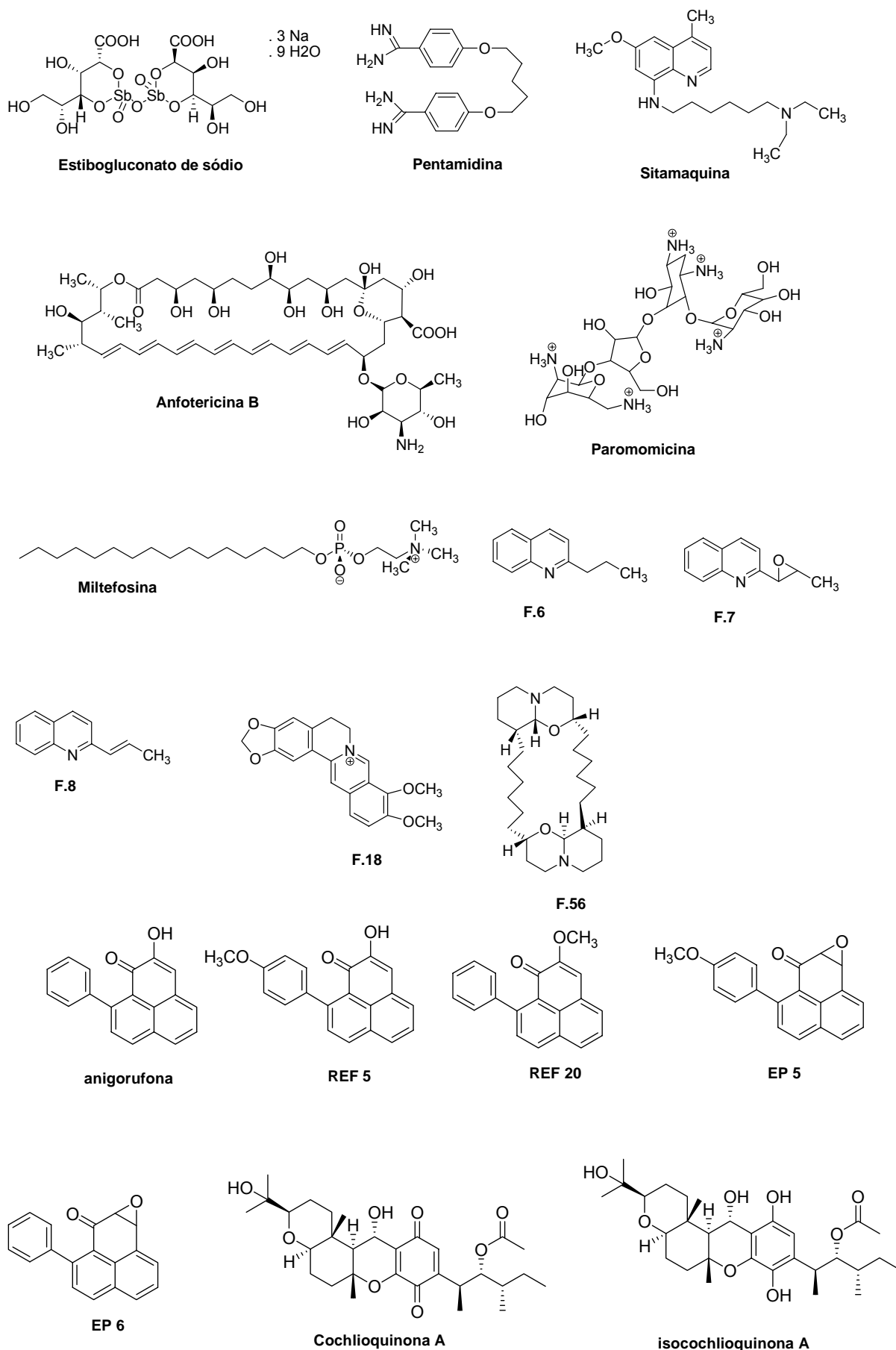


Figura 10. Fármacos e produtos naturais contra leishmaniose

1.6 Lactona sesquiterpênica enidrina

Smallanthus sonchifolius (Poepp & Endl) H. Robinson, conhecida popularmente como yacon, é membro da família Asteraceae. É cultivada como uma cultura de raiz desde os Andes colombiano até o nordeste da Argentina, em altitudes variando entre 1000 e 3500 m, tendo sua origem no leste dos montes andinos (GRAU; REA, 1997) e não requer o emprego de pesticidas no seu cultivo (INOUE et al., 1995).

As folhas de *S. sonchifolius* são utilizadas na medicina popular na forma de infusão para tratamentos de diabetes (VALENTOVÁ et al., 2001). Estudos comprovam que o extrato aquoso das folhas aumenta a concentração de insulina em ratos normais e diabéticos. Além disso, o extrato aquoso também reduz a produção de glicose em hepatócitos através das vias de gliconeogênese, além de atuar de forma similar à insulina (SCHORR, 2005). Ácido caurenóico e compostos relacionados foram isolados de extratos metanólicos das folhas de *S. sonchifolius* (KAKUTA et al., 1992). Adicionalmente, quatro lactonas sesquiterpênicas (LST) do tipo melampolimo, enidrina, uvedalina, sonchifolium e polimatin B, foram isoladas e identificadas de extrato metanólico das folhas (INOUE et al., 1995).

As lactonas sesquiterpênicas (LST) são consideradas marcadores químicos da família Asteraceae (SCHORR, 2005). As LTSs são unidades terpenoídicas C15 com anel lactônico cinco membros (γ -lactona ou butirólactona). O anel lactônico é na maioria das vezes α,β insaturado, com uma ligação dupla exocíclica. Estes metabólitos são biossintetizados e armazenados nos tricomas glandulares e sua produção pode estar associada com a proteção das plantas contra predadores devido às suas características alergênicas e sabor amargo (ARAKAWA, 2007).

As LST possuem diversas atividades biológicas como antimicrobianas, antitumorais, antiinflamatórias, neurológicas, cardiovasculares e alergênicas, dentre outras atividades (SCHORR, 2005). As atividades biológicas relacionadas às lactonas são atribuídas à presença do grupamento carbonílico α,β insaturado, subestrutura ou grupo farmacofórico que ocorre em γ -lactonas. Esse tipo de subestrutura presente no anel lactônico reage com grupos nucleofílicos através da adição tipo Michael (SCHORR, 2005).

O principal e constituinte majoritário dos extratos da folhas de *S. sonchifolius* é a enidrina, LST tipo melampolimo, localizada no tricomas glandulares (SCHORR; DA COSTA, 2005). A enidrina (Figura 11 p.24), apresenta atividade antidiabética

após administração em ratos (KAWASHIMA et al., 2001), além de terem sido relatadas atividades antiinflamatória (HWANG et al., 1996), antifúngica e antimicrobiana (INOUE et al, 1995).

O cultivo do yacon quase não tem necessidade de emprego de pesticidas, provavelmente devido às atividades inseticidas e antimicrobianas de seus compostos. Estudos de atividades antimicrobianas foram feitos com as LST tipo melampolido dos extratos das folhas. As três LST de maiores atividades antibacterianas foram, respectivamente, fluctuanina, uvedalina e enidrina. Todos estes três componentes possuem um grupo acetoxílico na posição C-9, responsável pela forte atividade antibacteriana. A atividade da uvedalina foi maior que da enidrina, e, a única diferença entre esses dois compostos é a presença do epóxido em C-4/C-5 na enidrina enquanto que na uvedalina há uma ligação dupla em C-4/C-5 (LIN et al., 2003).

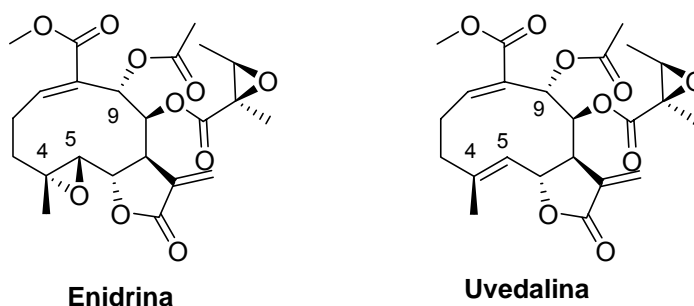


Figura 11. Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Smallanthus sonchifolius*

5. CONCLUSÕES

Os experimentos de biotransformação realizados em pequena escala não foram reprodutíveis em escala ampliada, onde houve aumento da quantidade de massa micelial e de substrato por frasco, além do aumento do tamanho do frasco. Isto pode ter ocorrido pelas diferenças de oxigenação entre os frascos de pequena e maior escala. Assim, a melhor estratégia para realização da triagem em pequena escala dos diferentes fungos em função do tempo nos experimentos de biotransformação da enidrina e da afidicolina foi realizar os experimentos já em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, com 200 mL de meio fermentativo, e com a adição de 20 mg de substrato por frasco. Desta forma, na ampliação de escala apenas ampliou-se em número de frascos para a obtenção de maior quantidade de produto, obtendo-se resultados reprodutíveis em relação à pequena escala (triagem).

O fungo endofítico *Papulospora immersa* SS13 foi o único que levou a formação de produto de biotransformação da enidrina. Este fungo catalisou a abertura regioselectiva do epóxido em C2'-C3', em detrimento ao epóxido presente no anel macrocíclico. O produto de biotransformação di-hidroxiado não foi previamente isolado como produto natural de nenhuma espécie vegetal até o momento. Portanto, este resultado corrobora resultados prévios de estudos de biotransformação microbiana de produtos naturais, onde os fungos têm se mostrado eficientes na produção de novos derivados de produtos naturais.

O fungo *P. immersa* SS13 é um endofítico isolado das folhas do yacon, e isso poderia facilitar o reconhecimento por parte do fungo do substrato de biotransformação, enidrina, lactona sesquiterpênica produzida pelas folhas desta mesma planta. Isto poderia auxiliar a explicar a razão de sua maior eficiência na biotransformação da enidrina, em relação aos demais fungos avaliados.

Não foram obtidos derivados da afidicolina através dos experimentos de biotransformação com os fungos avaliados. A baixa detecção da afidicolina em HPLC-DAD dificultou as análises dos extratos brutos de biotransformação da afidicolina. A utilização de um detector auxiliar HPLC-DAD-RID poderia permitir uma melhor detecção do diterpeno afidicolina e eventuais derivados formados e não detectados. Além disso, um maior número de fungos poderia ser testado, assim como tempos mais prolongados, na tentativa de se obter produtos de biotransformação da afidicolina.

A opção por realizar reações semi-sintéticas com a afidicolina foi mais produtiva, em comparação com a biotransformação. Foram obtidos dois derivados mono-éteres e um di-éter de silício, além dos derivados tetra- e tri-acetilados da afidicolina. Ainda, na purificação dos produtos reacionais isolou-se o produto natural 3-desoxiafidicolina.

A afidicolina, seus derivados semi-sintéticos e a 3-desoxiafidicolina foram submetidos ao ensaio leishmanicida frente a *Leishmania major*. As substâncias mais ativas foram os dois produtos naturais e o derivado tri-acetilado da afidicolina. A afidicolina também apresentou significativa atividade frente a *L. braziliensis*.

O aumento da atividade pode estar relacionado à maior capacidade dos compostos estudados em ultrapassar membranas celulares, em função dos valores de lipofilicidades obtidos teoricamente para todos os compostos. Apesar de preliminares, os dados sugerem que o derivado tri-acetilado da afidicolina pode atuar como pró-fármaco.

O fato da 3-desoxiafidicolina ter apresentado atividade leishmanicida semelhante à da afidicolina é bastante interessante, afinal um dos problemas para o desenvolvimento clínico da afidicolina como antitumoral é sua rápida metabolização *in vivo* ao derivado cetônico em C-3, inativo. Uma vez que a 3-desoxiafidicolina mantém a atividade leishmanida e não está sujeita ao mesmo metabolismo *in vivo* da afidicolina, este produto natural desponta como uma alternativa atraente para estudos posteriores de obtenção de derivados e avaliação da atividade leishmanicida.

Estudos da atividade citotóxica em células normais, assim como atividade dos derivados obtidos mais ativos em células infectadas com o parasita deverão ser realizados a fim de validar a afidicolina e derivados como candidatos a protótipos leishmanicida e auxiliar na proposição de novos derivados semi-sintéticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, E.; GHOSH DASTIDAR, P. P.; PAKRASHI, S. C. Studies on Indian medicinal plants- XXVIII. Sesquiterpene Lactones of *enhydra fluctuans* Lour. Structures of enhydrin, fluctuanin and fluctuadin. **Tetrahedron**, v.28, p. 2285-2298, 1972.

ARAKAWA, N. S. Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Vigueira robusta* Gardn. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Tese de Doutorado, 141pp. 2007.

AZERAD, R. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. New York: Springer-Verlag, p. 169-218, 1998.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Estratégias de modificação molecular. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed editora Ltda, 2001, cap 6, p 163-189.

BELLINGHAM, R. K.; CAREY, J. S.; HUSSAIN, N.; MORGAN, D. O.; OXLEY, P.; POWLING, L. C. A practical synthesis of a potent-opioid antagonist: use of a modified Knorr Pyrrole synthesis. **Organic Process Research & Development**, v. 8, n. 2, p. 279-282, 2004.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S. ; DURAN-PATRON, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron. Asymmetry**, v. 20, p. 385-397, 2009a.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 77, p 669-674, 2007.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of rac-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 945-952, 2008.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009b.

BORGES, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, tese de doutorado, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.- 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRUNDRET, KM; HESP, B; DALZIEL, W. X-Ray Crystallographic Determination of Structure of Antibiotic Aphidicolin - Tetracyclic Diterpenoid Containing A New Ring-System. **Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications**, v. 18, p. 1027-&, 1972.

BUCKNALL, R. A.; MOORES, J.; SIMMS, R.; HESP, B. Antiviral Effects of Aphidicolin, A New Antibiotic Produced By *Cephalosporium-Aphidicola*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 4, p. 294-298, 1973.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 162-195, 2005.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas Hipolipêmicas e Novas Tendências Terapêuticas. **Química Nova**, n. 2, v. 30, p. 425-430, 2007.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal metabolites from *cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (*Fabaceae*). **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e348, 2008.

CHAUDHARY, S. K.; HERNANDEZ, O. 4-Dimethylaminopyridine: an efficient and selective catalyst for the silylation of alcohols. **Tetrahedron Letters**, n 2, p 99-102, 1979.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 69, p. 10-16, 1988.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, p. 99-127, 2002.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, p. 119-122, 2005.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook, 5th Ed. Springer, Berlin, Germany, p. 1-26, 454p., 2004.

FRAGA, B. M.; GUILLERMO, R.; HERNANDEZ, M.; CHAMY, M. C.; GARBARINO, J. A. Biotransformation of two ent-Pimara-9(11),15-diene Derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 87-91, 2009.

GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTE, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 142-151, 2009.

GALLO, M. B. C.; PUPO, M. T.; BASTOS, J. K.; NUNES, A. S.; CAVALCANTI, B. C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFFO, L. V.; PESSOA, C. O. Atividade citotóxica de extratos de fungos endofíticos isolados de *Smallanthus sonchifolius*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 402-404, 2007.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GOPINATH, R.; PATEL, B. Tetrabutylammonium tribromide (TBATB)-MeOH: an efficient chemoselective reagent for the cleavage of tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS) Ethers. **Organic Letters**, n. 6, v.2, p. 4177-4180, 2000.

GOTO, H. Imunidade inata e imunopatonegia nas leishmanioses experimentais. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tese para obtenção do título de Livre-Docente, 2004.

GORDON, J. F.; HANSON, J. R.; JARVIS, A. G.; RATCLIFFE, A. H. Oxidation of aphidicolin and its conversion into 19-noraaphidicolan-16 β -ol. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, p.3019-3021, 1992.

GRAU, A.; REA, J. Yacon. [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson]. In: Hermamm, M. & Heller, J. (Eds.). *Andean Roots and Tubers: A hipa, Arracacha, Maca and Yacon. Promoting the Conservation and the Use of Underutilized Crops*. Italy, 21, 1997.

GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v 56, p. 253-263, 2001.

HANSON, J. R.; JARVIS, A. G. The transformation by *Cephalosporium aphidicola* of some aphidicolanes substituted on ring A. **Phytochemistry**, n. 6, v. 36, p. 1395-1398, 1994.

HANSON, J. R.; REESE, P. B.; TAKAHASHI, J. A.; WILSON, M. R. Biotransformation of some stemodane diterpenoids by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, n. 6, v. 36, p. 1391-1393, 1994.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, n. 19/20, v. 13, p. 895-901, 2008.

HIRANUMA, S.; SHIMIZU, T.; YOSHIOKA, H.; ONO, K.; NAKANE, H.; TAKAHASHI, T. Chemical modification of aphidicolin and the inhibitory effects of its derivatives on DNA polymerase-alpha *in vitro*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 1641-1644, 1987.

HWANG, D.; FISCHER, N. H.; JANG, B. C.; TAK, H.; KIM, J. K.; LEE, W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with inhibition of MAP kinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 810-818, 1996.

ICHIHARA, A.; OIKAWA, H.; HAYASHI, K.; HASHIMOTO, M.; SAKAMURA, S.; SAKAI, R. 3-deoxyaphidicolin and aphidicolin analogues as phytotoxins from *Phoma betae*. **Agric. Biol. Chem**, v. 48, n 6, p. 1687-1689, 1984.

INOUE, A.; TAMOGAMI, S.; KATO, H.; NAKAZATO, Y.; AKIYAMA, M.; KODAMA, O.; AKATSUKA, T.; HASHIDOKO, Y. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 845-848, 1995.

IPSEN, J.; FUSKA, J.; FOSKOVA, A.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of natural antitumor agents. 21. Conversions of aphidicolin. **The journal of organic chemistry**, v. 47, p. 3278-3282, 1982.

KAKUTA, H.; SEKI, T.; HASHIDOKO, Y.; MIZUTANI, J. Ent-kaurenic acid and its related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1562-1564, 1992.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 288-292, 2001.

KAWASHIMA, S.; SAKATO, M.; TERADA, S.; KOIDE, Y.; TANAKA, M.; KO, M. Antidiabetic agents containing lactones. JP2001247461. Kokai Tokkoyo Kho, Japão, 2001.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, p. 23-49, 2005.

LIN, F.; MORIFUMI, H.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 2154-2159, 2003.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; MARTINEZ, S.; SAUGAR, J. M.; ISQUIERDO, L. R.; ABAD, T.; LUIS, J. G.; PINERO, J.; VALLADARES, B.; RIVAS, L. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, n. 5, v. 48, p. 1534-1540, 2004.

MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1153-1169, 2007.

NEISIUS, N. M.; PLIETKER, B. Diastereoselective Ru-Catalyzed Cross-metathesis-dihydroxylation sequence. An efficient approach toward enantiomerically enriched syn-diols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 3218-3227, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NUSSBAUM, V. F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? **Angewandte Chemie**, v. 45, p. 5072-5129, 2006.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1993.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, n. 30, p. 1446-1455, 2007.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A., **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Research Signpost, p. 51-78, 2006.

RIZZO, C. J.; SMITH, A. B. Aphidicolin synthetic studies: a stereocontrolled end game. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I**, n. 5, p. 969-979, 1991.

ROCHA, B. A.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; SAID, S.; GOBBO-NETO, L.; DA COSTA, F. B. Biotransformation of the sesquiterpene lactone tagitinin C by the fungus *Aspergillus terreus*. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2ND, 2009, São Pedro. PS-225.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SALMINEN, S. O.; RICHMOND, D. S.; GREWAL, S. K.; GREWAL, P. S.; PARWINDER, S. Influence of temperature on alkaloids levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. **Entomol. Experim. Appl.**, v. 115, p. 417-426, 2005.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHORR, K. *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae): estudo fitoquímico, controle de qualidade e ensaios biológicos. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tese de doutorado, 272 pp., 2005.

SCHORR, K.; DA COSTA, F. B. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteracea) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v 16, p 161-165, 2005.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v. 99, p. 1007-1015, 1995.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate resistência bacteriana. **Química Nova**, n. 4, v. 29, p. 844-855, 2006.

SPADARI, S.; FOCHER, F.; KUENZLE, C.; COREY, E. J.; MYERS, A. G.; HARDT, N.; REBUZZINI, A.; CIARROCCHI, G.; PEDRALINOY, G. *In vivo* distribution and activity of aphidicolin on dividing and quiescent cells. **Antiviral Research**, v. 5, p. 93-101, 1985.

SPADARI, S.; SALA, F.; PEDRALINOY, G. Aphidicolin – A specific inhibitor of nuclear-DNA replication in Eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 7, p. 29-32, 1982.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de hansch. **Química Nova**, n. 4, v. 27, p. 631-639, 2004.

VALENTOVÁ, K.; CVAK, L.; MUCK, A.; ULRICHOVA, J.; SIMONEK, V. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **Eur. J. Nutr.**, v. 42, p. 61-66, 2001.

VERZA, M.; ARAKAWA, N. S.; LOPES, N. P.; KATO, M. J.; PUPO, M. T. Biotransformation of a Tetrahydrofuran lignan by the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 195-200, 2009.

ZHANG, J.; SUN, Y.; LIU, J.; YU, B.; XU, Q. Microbial transformation of three bufadienolides by *Nocardia* sp. and some insight for the cytotoxic structure-activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 6062-6065, 2007.

WHITE, J. D.; GREYER, M.; LEE, C. (R)-(+)-3,4-Dimethylcyclohex-2-en-1-one. **Organic Syntheses**, v. 82, p. 108, 2005.