



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO FARMÁCIA

Potencial atividade anti-*Leishmania amazonensis* das subfrações do extrato etanólico do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba/Macaé.

THAYS LINE FIGUEIRÊDO FREITAS LUIZ

Outubro 2021

THAYS LINE FIGUEIRÊDO FREITAS LUIZ

Potencial atividade anti-*Leishmania amazonensis* das subfrações do extrato etanólico do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba/Macaé.

Monografia Apresentada
ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do
Rio de Janeiro – Campus
Macaé como um dos
requisitos para obtenção
do título de farmacêutico.

Orientadora: Professora
Doutora Suzana Passos
Chaves

Co-orientadora:
Professora Doutora
Denise Oliveira
Guimarães

Macaé
Outubro 2021

CIP - Catalogação na Publicação

FL953p Figueiredo Freitas Luiz, Thays Line
Potencial atividade anti-Leishmania amazonensis das subfrações do extrato etanólico do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta Humiria balsamifera coletada na Restinga de Jurubatiba/Macaé. / Thays Line Figueiredo Freitas Luiz. -- Rio de Janeiro, 2021.
45 f.

Orientadora: Suzana Passos Chaves.
Coorientadora: Denise Oliveira Guimarães .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Farmácia, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Fungos Endofíticos . 3. Humiria balsmifera. 4. Leishmania amazonensis. 5. Produtos naturais . I. Passos Chaves, Suzana , orient. II. Oliveira Guimarães , Denise , coorient. III. Título.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me guiado até aqui e nunca ter me desamparado.

Aos meus pais por todo empenho e suporte e por sempre me incentivar a ser a minha melhor versão. Aos meus irmãos, em especial a minha irmã Lays, por estar lado a lado comigo durante todo esse tempo.

Aos meus amigos que foram essenciais para deixar toda essa caminhada mais gostosa e alegre.

Aos meus amigos do laboratório LIP, em especial Arieli, por todos os ensinamentos, risadas e ter feito tudo ser mais leve e divertido.

Aos professores da UFRJ Macaé pelo conhecimento a mim transmitido ao longo do curso.

À professora Suzana Passos Chaves e professora Denise Oliveira Guimarães pela orientação ao longo deste projeto.

Aos órgãos de fomento FAPERJ e PIBIC-UFRJ, pelo suporte financeiro ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A Leishmaniose é uma protozoonose, considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença negligenciada, e os tratamentos disponíveis na clínica apresentam graves efeitos colaterais, o que prejudica a adesão da terapia pelo(s) paciente(s). Nosso grupo testou a atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato bruto etanólico do fungo endofítico Hb12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* coletada na Restinga de Jurubatiba na busca de potenciais substâncias frente a leishmaniose tegumentar. O extrato apresentou boa atividade anti-promastigota e antiamastigota de *Leishmania amazonensis in vitro*, porém apresentou toxidez para macrófagos na concentração de 10 µg/mL. Buscando melhorar a efetividade e segurança do extrato bruto Hb12b2, foi proposto o fracionamento do mesmo, e a avaliação da atividade anti-*Leishmania* das frações obtidas. Para o fracionamento, foram utilizados métodos de partição líquido/líquido com os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e butanol além do emprego de cromatografia em coluna aberta com a fração em acetato de etila. A análise do perfil químico das subfrações em acetato de etila foi realizada utilizando método cromatográfico como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Nos ensaios biológicos, a atividade anti-promastigota e citotoxicidade celular foram avaliadas através do ensaio colorimétrico de MTT. Como resultado do fracionamento, temos que partindo de 2,37 g do extrato bruto foram obtidas as frações hexânica, acetato de etila e butanólica, com os respectivos rendimentos: 0,05 g, 0,148 g e 0,493 g. Da fração de acetato de etila, adquiriu-se 6 subfrações (F1-F6) que tiveram sua atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* testada, sendo as subfrações F2 e F3 as que apresentaram as melhores atividades anti-promastigota com IC₅₀ de 7,71 µg/mL e 18,74 µg/mL, respectivamente; as subfrações F3 e F6 demonstraram induzir citotoxicidade relevante com DL₅₀ de 5,49 µg/mL e 6,90 µg/mL, respectivamente, e as subfrações F5 e F6 apresentaram um bom perfil de pureza. Uma vez que o fungo endofítico utilizado para a obtenção do extrato bruto Hb12b2 foi isolado da planta *Humiria balsamifera*, as frações decocto, acetato de etila, diclorometano e butanólica da planta tiveram sua atividade anti-promastigota avaliada, mas nenhuma apresentou resultado significativo. Então, nos nossos resultados apresentados, vimos que as técnicas utilizadas para o fracionamento do extrato bruto foram eficientes, obtendo-se duas subfrações com bom perfil de pureza observado através de CLAE-DAD. Nossos resultados demonstram que a subfração F2 foi a que apresentou atividade anti-promastigota mais promissora, indicando a necessidade de estudos adicionais para isolamento do produto ativo desta fração.

Palavras chaves: Fungos endofíticos, *Humiria balsamifera*, *Leishmania amazonensis*, Produtos naturais.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Casos de leishmaniose tegumentar no Mundo em 2019..... | 11 |
| Figura 2: Casos de leishmaniose Visceral no mundo em 2019..... | 12 |
| Figura 3: Ciclo Biológico da <i>Leishmania spp</i> | 14 |
| Figura 4: Estruturas química da Piperovatina e dos derivados do ergosterol..... | 17 |
| Figura 5: Fluxograma das etapas no fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico de HB12b2..... | 21 |
| Figura 6: Placa de CCD das frações..... | 23 |
| Figura 7: Placa de CCD da partição líquido-líquido..... | 24 |
| Figura 8: Análise do perfil cromatográfico da subfração F1..... | 25 |
| Figura 9: Análise do perfil cromatográfico da subfração F2..... | 25 |
| Figura 10: Análise do perfil cromatográfico da subfração F3..... | 26 |
| Figura 11: Análise do perfil cromatográfico da subfração F4..... | 26 |
| Figura 12: Análise do perfil cromatográfico da subfração F5..... | 27 |
| Figura 13: Análise do perfil cromatográfico da subfração F6..... | 28 |
| Figura 14: Análise do perfil cromatográfico do branco da cultura do fungo endofítico HB12b2..... | 28 |
| Figura 15: Espectros de UV das Subfrações do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2..... | 29 |
| Figura 16: Principais espectros de UV do branco da cultura do fungo endofítico HB12b2..... | 30 |
| Figura 17: Atividade anti-promastigota das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto do fungo endofítico Hb12b2 de extraído de <i>Humiria balsamífera</i> | 31 |
| Figura 18: Avaliação da citotoxicidade induzida pelas subfrações acetato de etila do fungo endofítico HB12b2 em macrófago RAW164,7..... | 32 |
| Figura 19: Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> de frações da planta <i>Humiria balsamífera</i> . Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 33 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Dados utilizados no evaporador rotatório de acordo com cada solvente orgânico.. | 20 |
| Tabela 2: Solventes e proporções utilizadas | 20 |
| Tabela 3: Dados de pureza, IC ₅₀ e DL ₅₀ das subfrações do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2..... | 38 |

LISTA DE ABREVIACES

BAW- Butanol, acetato de etila, gua

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CLAE-DAD- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos

DMSO- Dimetilsulfóxido

EEA- Extrato Etanólico de Arroz

L- *Leishmania*

MTT- Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NO- xido nítrico

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAW- Propanol, acetato de etila e gua

Prof^a- Professora

ROS- Espécies Reativas de Oxignio

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | Formas clínicas e epidemiologia | 10 |
| 1.2 | Leishmaniose Tegumentar..... | 10 |
| 1.3 | A Leishmaniose Visceral..... | 12 |
| 1.4 | Ciclo Biológico da <i>Leishmania spp.</i> | 13 |
| 1.5 | Tratamento da Leishmaniose..... | 14 |
| 1.6 | Antimoniais | 14 |
| 1.7 | Pentamidina | 15 |
| 1.8 | Anfotericina B | 15 |
| 1.9 | Paromomicina..... | 16 |
| 1.10 | Produtos naturais no tratamento da Leishmaniose | 16 |
| 1.11 | Estado da Arte | 18 |
| 2 | OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 18 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 18 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 | Cultivo e obtenção do extrato etanólico bruto do fungo HB12B2 | 19 |
| 3.2 | Partição líquido-líquido do extrato bruto | 19 |
| 3.3 | Secagem dos extratos..... | 19 |
| 3.4 | Cromatografia em coluna a partir da fração butanólica e acetato de etila..... | 20 |
| 3.5 | Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... | 20 |
| 3.6 | Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 21 |
| 3.7 | Parasitas..... | 21 |
| 3.8 | Linhagem Celular | 22 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.9 | Atividade Anti-promastigota | 22 |
| 3.10 | Ensaio de Citotoxicidade | 22 |
| 3.11 | Análise estatística | 23 |
| 4 | RESULTADOS | 23 |
| 4.1 | Fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2..... | 23 |
| 4.2 | Avaliação do perfil químico da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2 através de CLAE-DAD..... | 24 |
| 4.3 | Espectro de UV das frações..... | 29 |
| 4.4 | Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto de fungo endofítico Hb12b2 isolado da planta <i>Humiria balsamifera</i> | 31 |
| 4.5 | Citotoxicidade <i>in vitro</i> das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto do fungo endofítico Hb12b2 em macrófagos RAW 264.7..... | 32 |
| 4.6 | Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> das frações da planta <i>Humiria balsamifera</i> | 33 |
| 5 | DISCUSSÃO | 34 |
| 6 | CONCLUSÕES | 38 |
| 6.1 | Conclusões Parciais | 38 |
| 6.2 | Conclusão Geral | 38 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária, considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde e classificada como umas das seis doenças endêmicas mais importantes do tipo parasitária (WHO, 2021). Sua transmissão no perímetro urbano está relacionada a falta de saneamento básico e é uma doença com grande capacidade de causar deformidades.

São causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LAISON & SHAW, 1987). Atualmente 20 espécies de *Leishmania* são descritas como agentes etiológicos da doença. Ao total, sete espécies foram identificadas no Brasil, sendo seis delas do subgênero *Viannia* (V) e uma do subgênero *Leishmania* (L). Destas, as três principais espécies de importância médica no país devido a forma clínica a ser desenvolvida após a infecção, são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, e as demais espécies são *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* sendo identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (GARCIA et al., 2011).

1.1 Formas clínicas e epidemiologia

A leishmaniose é caracterizada por possuir duas formas clínicas, Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral (DESJEUX, 1996). A estimativa é que mais de 300 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença, e que ocorra cerca 1 milhão de novos casos ao ano (BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018). Em 2018, no Brasil, mais de 16 mil novos casos de leishmaniose foram confirmados, sendo que a maioria dos casos corresponde a forma tegumentar da doença, cerca de 95%, enquanto 5% dos casos correspondem a forma visceral. A região Norte é a mais afetada pela doença com aproximadamente 30% dos casos (WHO, 2018).

1.2 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar ou Leishmaniose Tegumentar Americana, é uma doença infecciosa pouco letal e não contagiosa. Sua transmissão ocorre através de vetor, insetos flebotomíneos, que estão infectados pelo protozoário *Leishmania* (VASCONCELOS, 2018).

A Leishmaniose Tegumentar é um problema de saúde pública de muitos países, principalmente os que apresentam clima tropical e, está presente em 85 países e em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) (Figura 1).

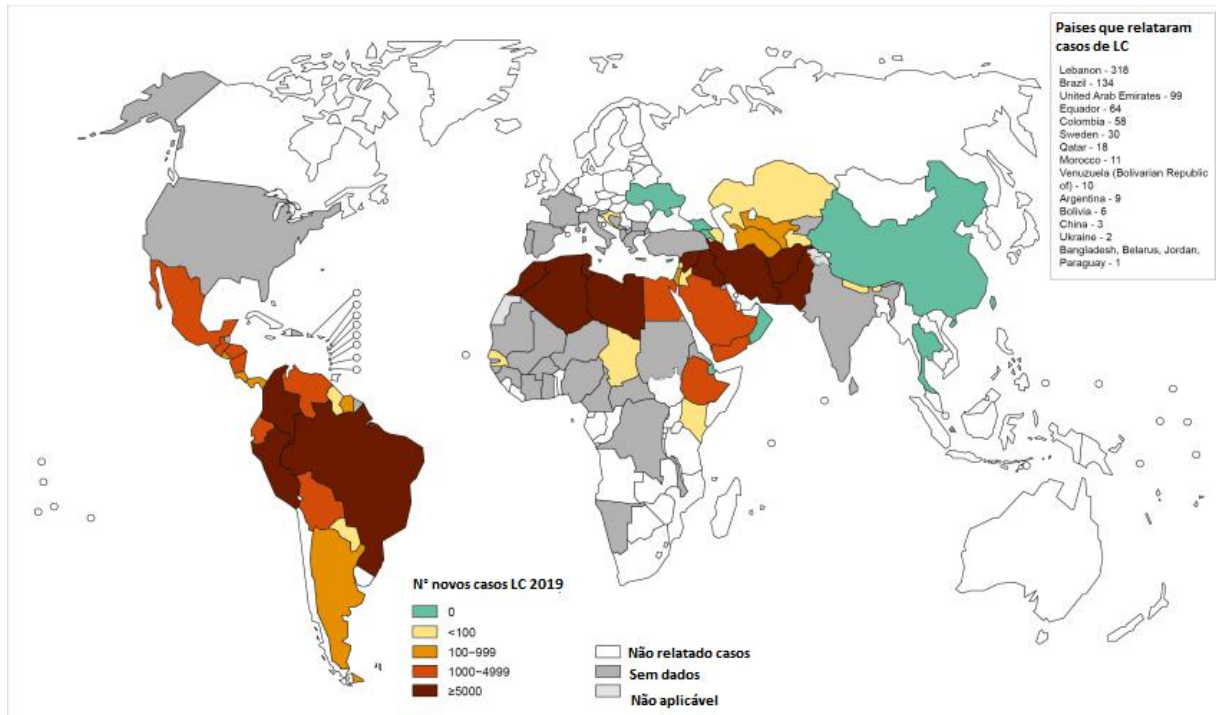


Figura 1: Casos de leishmaniose tegumentar no Mundo em 2019 (WHO, 2021).

A Leishmaniose Tegumentar apresenta-se nas seguintes subclassificações: cutânea, disseminada, mucocutânea e difusa. A Leishmaniose Tegumentar Cutânea é caracterizada por uma pápula eritematosa que se desenvolve em uma lesão normalmente indolor, circular, com bordas delimitadas e tamanhos variados, localizada onde ocorreu o repasto sanguíneo do vetor (REITHINGER, 2007). A forma Disseminada, é considerada uma forma clínica rara, sendo observada em até 2% dos casos, caracterizada pelo aparecimento de muitas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem diferentes partes do corpo, com mais frequência a face e o tronco. A forma clínica Mucocutânea é caracterizada como uma evolução da infecção primária, aparecendo lesões que atingem principalmente a região oral e nasofaringe, tardiamente após cicatrização das lesões primárias, podendo ocorrer uma resposta inflamatória exacerbada com capacidade de desfigurar devido as lesões necróticas. A forma Difusa, que tem como principal característica um comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, e em consequência formações de lesões como eritemas, pápulas, nódulos, tubérculos e infiltrações difusas na pele (BRASIL, 2017) e a uma das principais espécies responsáveis pela forma cutânea é a *Leishmania braziliensis*, e pela forma difusa é a *Leishmania amazonensis*.

1.3 A Leishmaniose Visceral

A forma visceral é causada pelas espécies *Leishmania donovani* no Velho Mundo e no Brasil a espécie responsável é *Leishmania chagasi* (VAN GRIENSVEN, DIRO, 2012). São mais de 80 países da África, Ásia Oriental e América do Sul que apresentam casos de Leishmaniose Visceral (figura 2), e a população que mais desenvolve a doença são os mais pobres. Os países que estão no *ranking* de maiores números de casos são: Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão do Sul, Somália e Sudão (DNDI, 2020).

A forma visceral é uma doença crônica e pode atingir uma letalidade de 10% quando o tratamento não é feito de forma correta. O parasito ao atingir a corrente sanguínea afeta os órgãos com maiores concentrações de macrófagos, principalmente o fígado, baço, medula óssea e linfonodo, onde pode levar a aumento do tamanho desses órgãos. Além disso sintomas como febre, complicações cardíacas e circulatórias, perda de peso e infecções associadas são relatados. O número de casos da doença no Brasil foi aumentando ao longo dos anos 80 e 90, principalmente na região nordeste, que até nos dias de hoje é uma região endêmica (MAIA-ELKHOURY, *et al*, 2008).

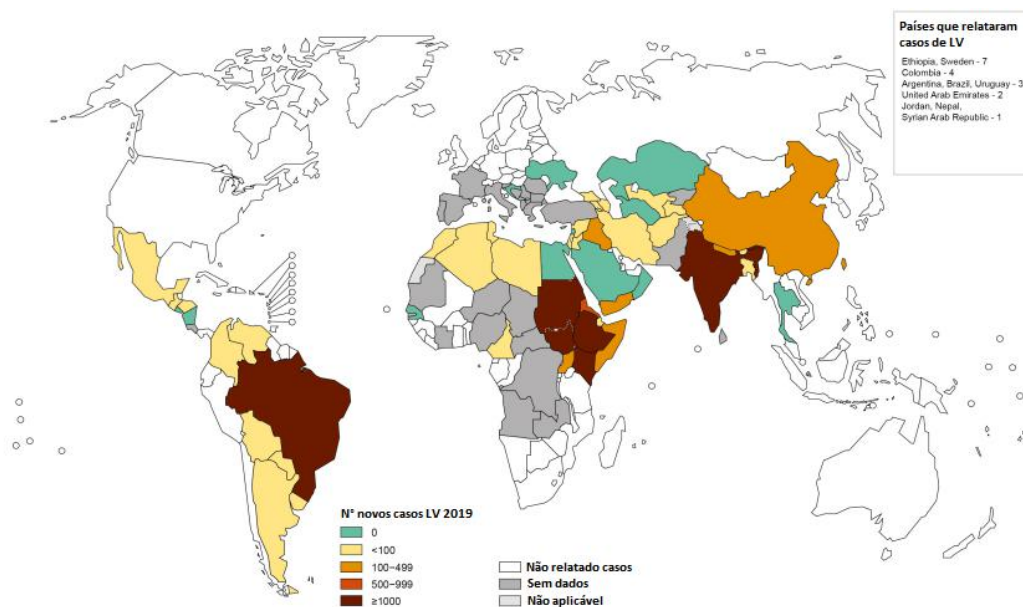


Figura 2: Casos de leishmaniose Visceral no mundo em 2019 (WHO, 2021)

1.4 Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.

A *Leishmania* é um protozoário unicelular e intracelular obrigatório que infecta células do sistema imune, e se apresenta em duas formas evolutivas principais: amastigotas e promastigotas (GARNHAM, 1971). A forma promastigota possui forma alongada com flagelo aparente na região anterior, vive parasitando o intestino do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é arredondada, possui flagelo não aparente e ausência de motilidade, sendo essa forma intracelular obrigatória. O macrófago é a célula-alvo do parasito no sistema imune (SACKS, 2001).

O vetor responsável pela transmissão da doença é a fêmea do flebotomíneo da ordem Diptera, da família Psychodidae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, responsável pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, responsável pela transmissão no Novo Mundo. A transmissão ocorre pela picada do inseto vetor. Os hospedeiros definitivos vertebrados podem ser de diferentes espécies. Dentre elas destacam-se os roedores, cães e primatas, incluindo humanos (LAINSON *et al.*, 1994). O ciclo (figura 3) inicia-se quando durante o repasto sanguíneo promastigotas metacíclicas são regorgitadas no local onde ocorreu a hematofagia, sendo fagocitados por células fagocíticas, preferencialmente macrófagos que se deslocam para o local da infecção. No ambiente intracelular, no interior dos fagolisossomos o parasito passa para a forma amastigota, sem flagelo aparente, esse processo pode variar de 1 a 5 dias *in vitro* no caso da *Leishmania amazonensis* (COURRET *et al.*, 2001). Em seguida inicia uma replicação binária, onde as amastigotas multiplicando-se até as células romperem, liberando as mesmas para o ambiente extracelular, as quais podem infectar novos macrófagos adjacentes, estabelecendo a infecção e reiniciando o ciclo no hospedeiro. O ciclo tem sua continuidade ao ser realizado um novo repasto sanguíneo pelo vetor em um hospedeiro infectado, no qual parasitos em sua forma amastigota no interior de macrófagos são aspirados. Essas formas serão liberadas no intestino do flebotomíneo após lise do macrófago, tornando-se promastigota após algumas horas. Promastigotas migram para faringe, região anterior do inseto, onde em um novo repasto sanguíneo, esses parasitos são regorgitados no local da picada (GARNHAM, 1971).

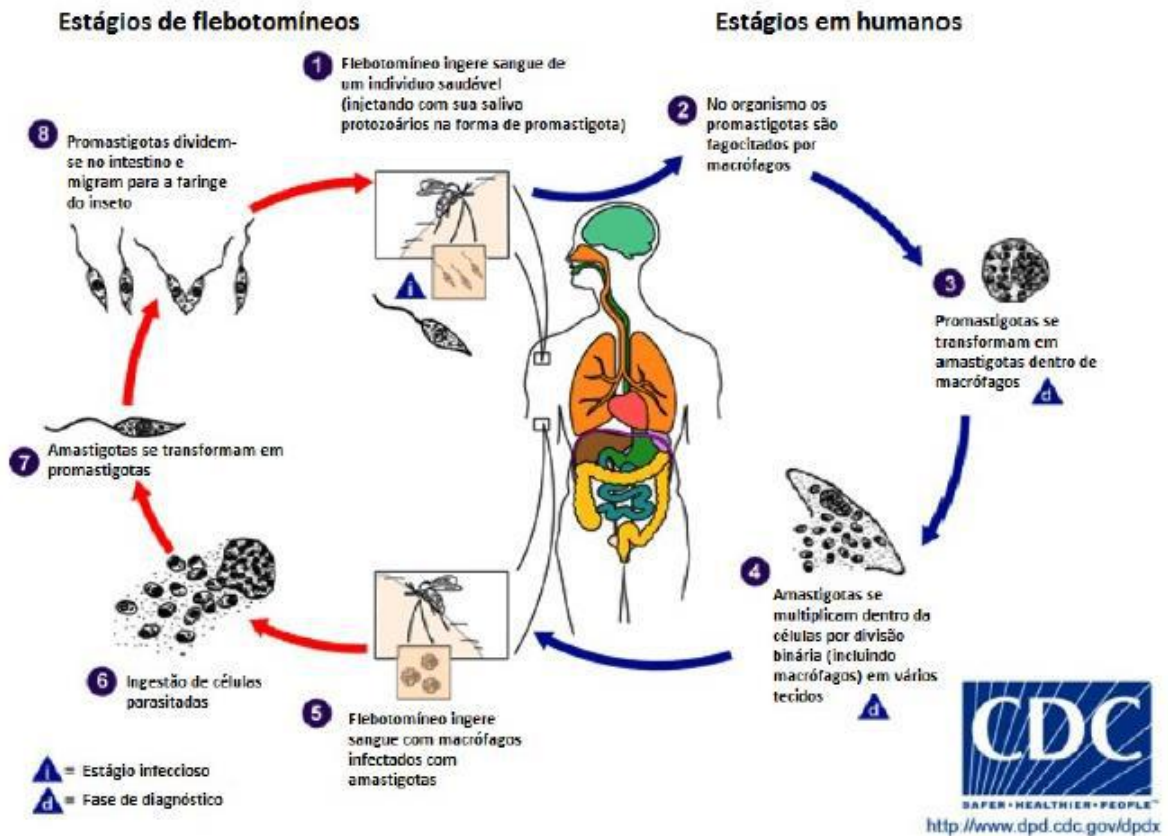


Figura 3: Ciclo Biológico da *Leishmania* spp. (Adaptado de CDC,2021)

1.5 Tratamento da Leishmaniose

Diferentes fármacos são eficazes contra a leishmaniose. No entanto, a maioria apresenta toxicidade considerável, com muitos efeitos colaterais, difícil administração, pois são em sua maioria na forma injetável, e tratamento de longa duração, consequentemente com baixa adesão do paciente (RATH, 2003). Por essa razão encontrar novas soluções terapêuticas anti-*Leishmania* têm sido alvo de grupos de pesquisa em busca de um novo fármaco.

1.6 Antimoniais

Os antimoniais são a primeira linha de tratamento anti-*Leishmania*. A forma amastigota do parasito é sensível aos antimoniais, e a hipótese que sua destruição é feita através da inibição de algumas enzimas, como a tripanotona redutase, necessária para sobrevivência do parasita (SOARES-BEZERRA *et al*; 2004). Outra hipótese é que a enzima superóxido dismutase seja

inibida ocasionando o aumento dos níveis de radicais superóxidos e com isso causando a morte do parasito (RAYCHAUDHURY, B *et al* , 2005). No Brasil, o medicamento é utilizado como fármaco de primeira escolha na terapêutica da leishmaniose e o antimônio utilizado é o antimoniato de n-metil-glucamina (SILVA *et al*, 1997). O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina. Antimoniato de n-metil-glucamina é eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (CARVALHO, 2019). Embora seja o medicamento mais usado nas últimas décadas, a resistência e a alta toxidez colocaram sérios desafios em seu uso para o tratamento da leishmaniose (IRANPOUR, HOSSEINZADEH, ALIPOUR, 2019).

1.7 Pentamidina

A pentamidina é um fármaco do grupo das diamidas utilizado no tratamento da leishmaniose (PAULA *et al*; 2003). Ela tem sua eficácia em leishmaniose visceral, comumente no tratamento de casos que não respondem aos antimoniais ou aqueles em que o paciente tenha sensibilidade ao composto. Um fator limitante deste fármaco é que possui alta toxidez e efeitos colaterais como: hipoglicemia, alterações cardiológicas, nefrotoxidez e em alguns casos pode ocasionar a morte do paciente (PICCICA *et al*, 2021). O mecanismo de ação ainda não é bem elucidado, mas estudos sugerem que atua alterando a replicação e transcrição mitocondrial do parasito. Outra hipótese é que a pentamidina inibe de forma direta a S-adenosilmetionina descarboxilase, enzima importante para biossíntese de espermidina molécula essencial para o parasito (BASTOS *et al*, 2016).

1.8 Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico desenvolvido da cepa de *Streptomyces nodosus*, e é utilizado no tratamento da leishmaniose. Seu mecanismo de ação é através da formação de complexos com ergosterol presente nas membranas celulares de fungos e lanosterol presente nas membranas celulares de espécies *Leishmania*, e ao formar esses complexos altera a permeabilidade da membrana, criando poros que permitem a saída de água e moléculas essenciais para à sobrevivência do parasito (ADLER-MOORE, 2016). Sua administração mais eficaz é feita por via intravenosa e apesar da anfotericina B ser eficaz ela possui uma toxidez considerável. Por esse motivo foi formulada para ser adicionada em lipossomas, a anfotericina lipossomal, tornando-a menos tóxica, pois é mais absorvida pelas células fagocitárias, que são as células preferenciais do parasito (YARDLEY, 2000). A anfotericina B lipossomal que possui

o nome comercial de AmBisome[®], e provou ser eficaz tanto no tratamento da leishmaniose cutânea, como mucocutânea e leishmaniose visceral (WEI *et al*, 2020), podendo ser utilizado por pacientes que apresentaram problemas no uso de antimoniais (AMATO, 2011).

1.9 Paromomicina

A paromomicina também conhecida como aminosidina, um aminoglicosídeo natural, é utilizada no tratamento da leishmaniose. Os testes utilizando a forma injetável da substância mostrou eficácia, tanto *in vitro* e *in vivo* (BEN SALAH, 2013). O mecanismo de ação nas bactérias já é bem elucidado, porém em parasitos como *Leishmania* sua ação não foi determinada com clareza, porém existem estudos *in vitro* que sugerem uma ação da paromomicina em um efeito inibitório no ribossomo do parasita, desta forma o complexo de formação é prejudicado rompendo polissomos em monossomos não funcionais, causando uma alteração na sínteses de proteínas, dificultando o crescimento do parasito (SHALEV-BENAMI *et al*, 2017).

1.10 Produtos naturais no tratamento da Leishmaniose

Os produtos naturais são a subárea da química orgânica mais estudada. Desde a época do homem primitivo a natureza era a fonte fundamental e ele se utilizava dela, principalmente das plantas, para cura de enfermidades. O avanço da tecnologia na área de biologia molecular tornou possível análises de maior qualidade em sistemas biológicos. Hoje se sabe o vasto uso dos produtos naturais na indústria alimentícia e farmacêutica, e países como o Brasil, que possuem grande biodiversidade, têm um crescimento nas pesquisas principalmente com foco em produtos naturais de micro-organismos (OLIVEIRA, 2013).

Produtos naturais ainda são uma das principais fontes de novos medicamentos. Bactérias e fungos provaram ser ótimas fontes de novos produtos naturais, e avanços de pesquisas nessas áreas mostraram que o potencial na biossíntese de produtos naturais oriundos de fungos vem crescendo a cada ano (XIE, 2014). Plantas podem ter sua composição química alterada através de organismo endofíticos, como fungos, portanto produtos naturais podem conter metabólitos ativos desses organismos (ATANASOV, 2015).

Substância isolada do extrato etanólico retirados da planta da Amazônia, *Aniba panurensis*, em diferentes concentrações, foi utilizada em testes usando cepas de *Leishmania amazonensis*, e observou-se que o crescimento dos parasitos foi afetado após 72 horas de tratamento, com IC₅₀ de 95,7 µM (DE SOUZA, 2020). O óleo essencial extraído das folhas da

planta *Scheelea phalerata*, sob duas condições sazonais diferentes (estações seca e chuvosa) e suas atividades biológicas foram testadas contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, onde o óleo essencial da estação chuvosa apresentou atividade leishmanicida, com IC₅₀ 165,05 µg/mL (OLIVEIRA, 2020).

Extratos de culturas do fungo *Apiospora montagnei* Sacc., forma sexuada de *Arthrinium*, isolado como endofítico de *Smallanthus sonchifolius* (yacon), demonstrou em estudos anteriores ser uma fonte promissora de metabólitos secundários distintos, apresentando atividade antiparasitária contra *Leishmania tarentolae*. O extrato em acetato de etila foi posteriormente fracionado por cromatografia líquida a vácuo e as frações resultantes foram subfracionadas em diferentes tipos de cromatografia onde dez substâncias foram isoladas, sendo a substância VII e IX substâncias derivadas do ergosterol (figura 4), apresentando IC₅₀ 12,54 e 3,04 µg/mL contra *Leishmania braziliensis* e 8,78 e 2,87 µg/mL, contra *Leishmania chagasi* respectivamente, reforçando que fungos endofíticos e seus metabólitos são fontes promissoras para tratamento de leishmanioses (RAMOS, 2013).

Fungos endofíticos associados a planta *Piper* sp., coletada no Parque Estadual do Rio Doce em Minas Gerais, foram usados como fonte de metabólitos ativos e utilizados em testes biológicos, sendo a Piperovatina (figura 4) o principal constituinte encontrado nos óleos essenciais de várias espécies do gênero *Piper*. Esses fungos foram usados para produzir extratos etanólicos, que foram testados para sua atividade antiparasitária. Ao total foram produzidos 540 extratos. Dentre eles 5 deles apresentaram atividade contra *Leishmania amazonensis* e o extrato UFMGCB 15841 apresentou maior inibição, com percentual de inibição de crescimento de 72% (FLORINDO, 2019).

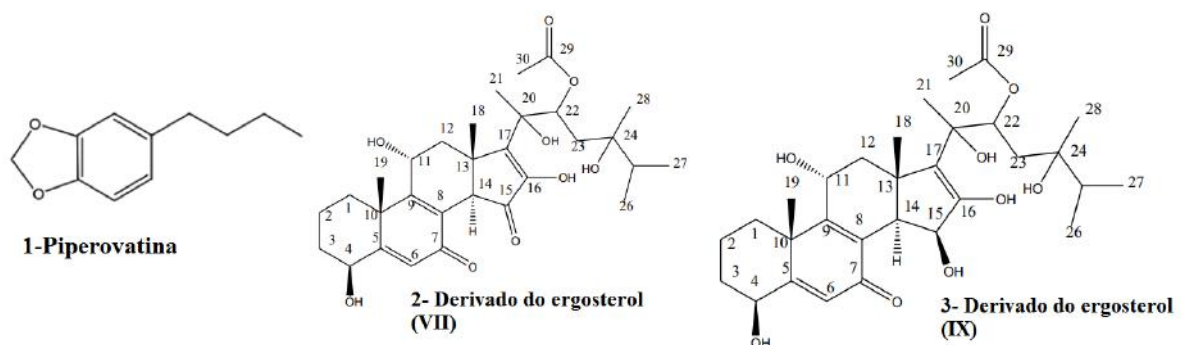


Figura 4: Estruturas química da Piperovatina e dos derivados do ergosterol (substância VII e IX).
FONTE: Marques et al. (2017), Ramos, (2013).

Os fungos são considerados fontes prósperas de novos fármacos para uso terapêutico, e de fato, diversos medicamentos utilizados na clínica são derivados de metabólitos de fungos (STROBEL & DAISY, 2003). Testes utilizando fungos para verificar possíveis metabólitos com atividades leishmanicidas são conduzidos por muitos grupos de pesquisa. Estes testes buscam não só descobrir se os fungos possuem metabólitos ativos, mas também, identificar classes de metabólitos das quais as substâncias ativas façam parte, analisar mecanismos de ação e verificar atividade *in vivo* e *in vitro* de possível potencial terapêutico (AZEVEDO, 2020).

Um exemplo é o fungo *Penicillium janthinellum*, isolado como um fungo endofítico dos frutos de *Melia azedarach*, exibindo 100% de atividade anti-promastigotas de *Leishmania mexicana* depois de 48 h a uma concentração de 40 µg/mL (MARINHO, 2005). Um novo fungo endofítico, *Mycosphaerella* sp. associado à folhagem da planta *Psychotria horizontalis* apresentou cercosporina, um metabólito que foi utilizado contra amastigotas de *Leishmania donovani*. As amostras foram testadas e foi obtido a inibição do crescimento do parasito superior a 70%, com IC₅₀ 0,46 µM (MORENO, 2011).

1.11 Estado da Arte

Um total de 45 extratos de fungos endofíticos de *Humiria balsamifera* e *Tocoyena bullata*, plantas da Restinga de Jurubatiba, foi testado em ensaio anti-promastigota de *Leishmania amazonensis in vitro*. Somente o extrato etanólico bruto do fungo endofítico Hb12b2 foi ativo (IC₅₀ = 10 µg/mL). Este extrato também apresentou atividade anti-amastigota *in vitro* (IC₅₀ = 1,8 µg/mL) em macrófagos de medula de camundongos BALB/c. Depois, na avaliação de toxicidade celular, o extrato apresentou toxicidade nas concentrações mais elevadas testadas (ROCHA, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Fracionar o extrato etanólico bruto do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* e avaliar o potencial uso terapêutico das frações no modelo de leishmaniose tegumentar.

2.2 Objetivos Específicos

- Fracionar o extrato etanólico bruto do fungo endofítico HB12b2.

- Avaliar a atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* das frações do extrato etanólico bruto do fungo endofítico HB12b2.
- Avaliar a toxidez *in vitro* das frações do extrato etanólico bruto do fungo endofítico HB12b2 em linhagem de macrófagos RAW267.4.
- Avaliar a atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* das frações da planta *Humiria balsamifera*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo e obtenção do extrato bruto etanólico do fungo HB12b2

A espécie vegetal selecionada para o isolamento dos micro-organismo, a planta *Humiria balsamifera*, foi coletada na Restinga de Jurubatiba, localizada no município de Quissamã - RJ. O cultivo do fungo foi realizado em meio sólido de arroz e extraído com etanol para a obtenção do EEA (extrato etanólico de Arroz). O arroz de cultivo é o mesmo utilizado para análise do branco do fungo. Essa etapa foi em parceria com o grupo de pesquisa da Professora Dr^a Denise Guimarães- UFRJ/Macaé, e toda coleta e acesso à biodiversidade desta planta e do fungo seguiu a legislação vigente, sob o protocolo SisGen n^o do cadastro AAA989F. Devido a não identificação até o presente momento do fungo isolado, foi utilizado um código de acordo com a espécie na qual foi coletado e o meio de cultivo, sendo então denominado HB12b2.

3.2 Partição líquido-líquido do extrato bruto

Inicialmente, foi realizada uma partição líquido-líquido, a partir de 2,37g do extrato bruto. Foram utilizados 90 mL de água destilada e 10 mL de metanol para a dissolução do extrato. Após a dissolução, foi feita a partição líquido-líquido utilizando três solventes diferentes: hexano (Tedia[®]), acetato de etila (Tedia[®]) e butanol (Tedia[®]) A solução hidroalcolica do extrato bruto HB12b2 (100 mL) foi colocada em funil de partição e procedeu-se com a partição em ordem crescente de polaridade (3 x 40 mL, cada) dos solventes listados acima. Após agitação do funil, foi coletado a fração orgânica e a fração aquosa.

3.3 Secagem dos extratos

O processo de retirada do solvente orgânico foi por meio de evaporador rotatório (BUCHI[®]), as frações de acetato de etila, hexânica e butanólica foram levadas separadamente ao aparelho como rotação, temperatura e pressão específicas para cada solvente conforme na Tabela 1.

Tabela 1: Dados utilizados no evaporador rotatório de acordo com cada solvente orgânico

| | FRAÇÃO HEXÂNICA | FRAÇÃO BUTANÓLICA | FRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---|
| Rotação (rpm) | 80 | 80 | 80 |
| Temperatura (° C) | 35,8 | 35,8 | 35,8 |
| Pressão (mbar) | 300 | 50 | 200 |

3.4 Cromatografia em coluna a partir da fração butanólica e acetato de etila

A fim de dar continuidade ao processo de separação iniciado pela partição líquido-líquido, a cromatografia em coluna foi feita. A fração butanólica foi submetida em cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária a Sephadex, e o eluente utilizado foi o metanol (Tedia®). 17 subfrações da fração butanólica foram coletadas.

A partir da fração em acetato de etila utilizou-se como fase estacionária sílica gel. Os eluentes utilizados foram solventes em proporção crescente de polaridade listados na tabela 2, indo do hexano (Tedia®) ao metanol (Tedia®). Subfrações da fração de acetato de etila foram recolhidas com 1 minuto de fluxo a cada amostra recolhida.

Tabela 2: Solventes e proporções utilizadas

| SOLVENTES | PROPORÇÃO | VOLUME TOTAL |
|-------------------------|------------------|---------------------|
| Hexano/Acetato de etila | 7:3 | 100 mL |
| Hexano/Acetato de etila | 1:1 | 100 mL |
| Acetato de etila/Hexano | 7:3 | 100 mL |
| Acetato de etila/Hexano | 4:1 | 100 mL |
| Acetato de etila/Hexano | 9:1 | 100 mL |
| Metanol | 100% | 50 mL |

3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise prévia, tanto das frações iniciais quanto das subfrações, foi utilizado a cromatografia em camada delgada. Para tal utilizou-se como fase móvel o acetato de etila (Tedia®) e hexano (Tedia®) (7:3) para as frações em acetato de etila e hexânica. Para a fração butanólica a melhor fase móvel utilizada foi o BAW (Tedia®) (4:1:5). A revelação foi através

de luz UV (254 e 366 nm). Um resumo das etapas anteriores foi representado no fluxograma da figura 5.

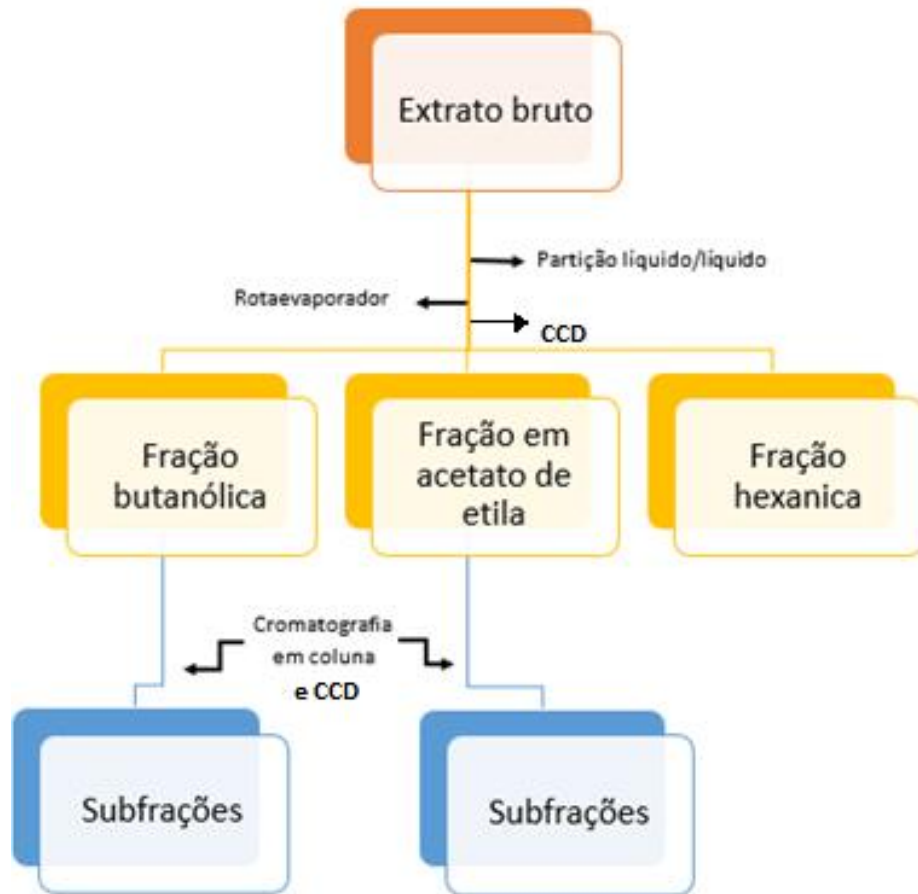


Figura 5: Fluxograma das etapas no fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico de HB12b2.

3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) da marca Shimadzu® foi realizada utilizando coluna C18 fase reversa (Luna-Phenomenex). Sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min. Comprimento de onda analisados foram 254 nm e 365 nm. Foram injetados extratos na concentração de 0,5 mg/mL.

3.7 Parasitos

Foi utilizada a cepa MHOM/BR/75/Josefa (Josefa) de *Leishmania amazonensis* isolada de lesões de camundongos, mantida em cultura sob a forma promastigota a 26° C em meio Schneider (Gibco) com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (HIFCS), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os parasitos foram utilizados na fase estacionária da cultura.

3.8 Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, obtida de cultivos celulares pré-existentes. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 50 mL com meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37° C / 5% de CO₂. Repiques celulares foram feitos quando a confluência celular foi alcançada na garrafa, em média a cada 3 dias de cultura, utilizando rodinho para raspar as células e fazer uma nova cultura com a proporção de 1:10 com 5 mL no volume total. Células confluentes foram utilizadas para o desenvolvimento do ensaio de citotoxicidade.

3.9 Atividade Anti-promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* ($2,5 \times 10^6$ /mL) cultivadas em meio Schneider (Gibco) foram plaqueadas em placa de 96 poços com as subfrações do extrato etanólico bruto de fungos endofíticos HB12b2 nas concentrações indicadas ou Anfotericina B (10 µM) por 48 horas a 26° C. Já para os extratos da planta *Huminira balsamifera*, promastigotas (10^7 /mL) foram incubadas com diferentes concentrações dos extratos ou Anfotericina B (10 µM) por 48 horas a 26° C. A viabilidade dos promastigotas foi analisada através de ensaio colorimétrico de MTT (MOSMANN,1989). Resumidamente, ao final do experimento 10 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. A placa é deixada em repouso, ao abrigo da luz e a 26° C por 4 horas. Então, 100 µL de DMSO/poço foram adicionados e a leitura realizada através espectrofotometria (490nm).

3.10 Ensaio de Citotoxicidade

Para análise da citotoxicidade, macrófagos da linhagem celular imortalizada RAW 264.7 (2×10^6 /poço) em placas de 96 poços, foram deixados em repouso por 24 horas em estufa a 37° C / 5% de CO₂, e então incubados com as concentrações indicadas das amostras por 48 horas a 37° C / 5% de CO₂. Então a viabilidade dos macrófagos foi avaliada através de ensaio

colorimétrico de MTT conforme descrito no item 3.9. Triton 2% foi utilizado como controle positivo do ensaio.

3.11 Análise estatística

Para comparar as diferenças entre as médias das replicatas dos experimentos, o teste T de Student ou a Análise da Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey de múltiplas comparações foram utilizados utilizando GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2

Após a partição líquido-líquido a partir de 2,37 g do extrato bruto etanólico do fungo endofítico HB12b2, as frações hexânica, em acetato de etila e butanólica obtiveram as respectivas quantidades: 0,05 g, 0,148 g e 0,493 g. A porção hidroalcolica remanescente obteve rendimento de 1,13g.

A cromatografia em camada delgada revelou o perfil químico em cada fração. De acordo com os números de bandas formadas foi possível verificar que substâncias possuíam diferentes polaridades, ilustrando a eficiência do processo de partição líquido-líquido (Figura 6).

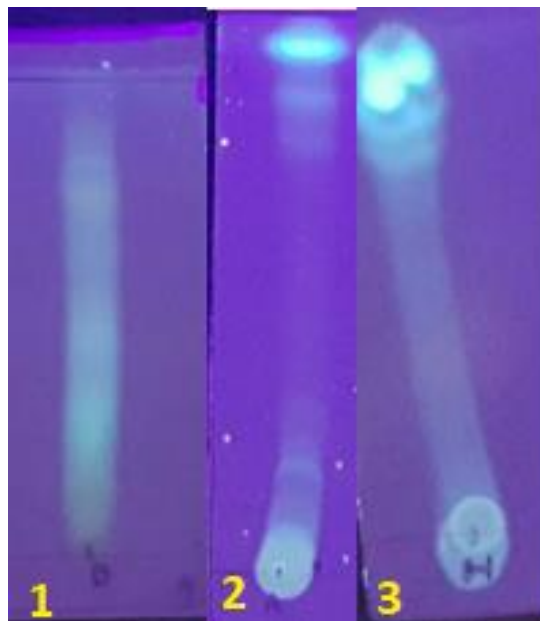


Figura 6: Placa de CCD das frações butanólica (1), em acetato de etila (2) e hexânica (3). Revelação UV 254 nm. Sistema de fase móvel BAW(4:1:5) na fração butanólica, acetato de etila/hexano (7:3) na fração em acetato e acetato de etila/Hexano (1:1) na fração hexânica.

Após a cromatografia em coluna feita com a fração butanólica foi possível a obtenção de 17 amostras. Durante a tentativa de grupamento das amostras foram feitas CCDs utilizando sistema de fase móvel com BAW (4:1:5), hexano, hexano/acetato de etila (1:2/1:3/1:4) e acetato de etila, porém sem sucesso no agrupamento.

A CCD da fração em acetato de etila citada anteriormente obteve 5 bandas distintas, indicando 5 possíveis substâncias com polaridades diferentes. Com base nesse resultado foi preparada uma coluna cromatográfica a fim de aumentar o grau de pureza da separação. Com isso foram coletadas 50 amostras iniciais (Figura 7) e com ajuda de análises cromatográficas foi possível agrupá-las em 6 subfrações com respectivas massas: 7,5 mg (Fração F1 - amostras 1 a 7), 1 mg (Fração F2- amostras 8 e 9), 5,2 mg (Fração F3 -amostras 10 e 11), 3,1 mg (Fração F4 -amostras 12 a 19), 6,4 mg (Fração F5 - amostras 20 a 37) e 10,1 mg (Fração F6 – amostras 38 a 50).

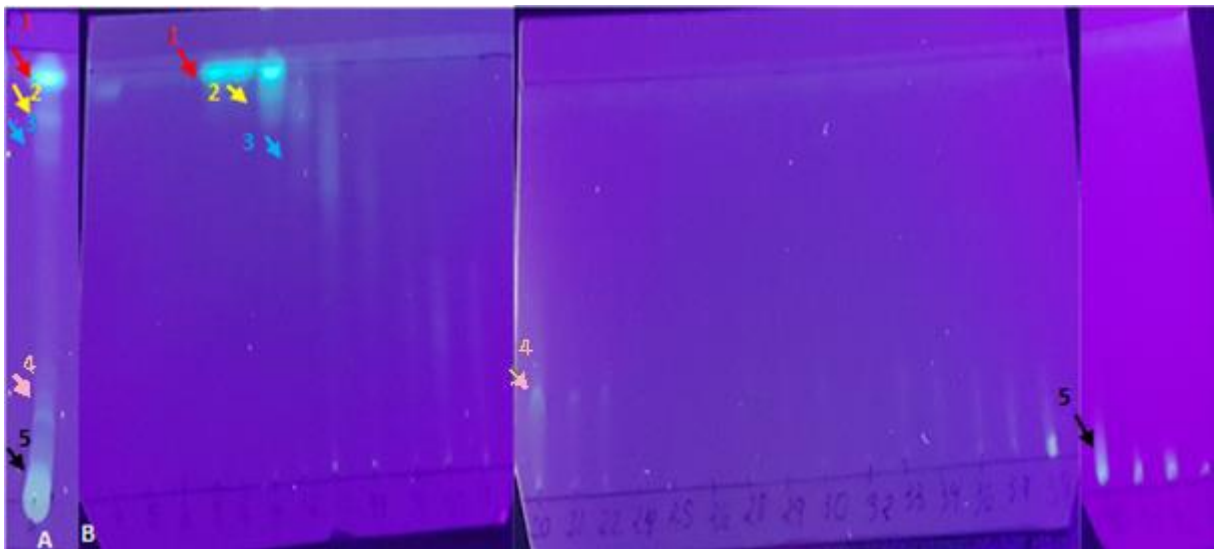


Figura 7: Placa de CCD da partição líquido-líquido (A) e da coluna cromatográfica (B) da fração em acetato de etila, e bandas que se assemelham entre as duas placas (1-5). Revelação UV 254 nm. Sistema de fase móvel Acetato de etila/Hexano (7:3)

4.2 Avaliação do perfil químico da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2 através de CLAE-DAD.

Essa análise permitiu identificar o perfil químico das subfrações através dos picos gerados de acordo com tempo de retenção no espectro de ultravioleta gerado em 254 nm. O cromatograma da subfração F1 (figura 8) apresentou três picos majoritários nessa condição analítica, nos tempos de retenção de 40,1, 57,0 e 60,9 minutos. O cromatograma da subfração

F2 (figura 9) apresentou dois picos, no tempo de retenção 57,0 e 60,9 minutos, sendo o pico majoritário o de 60,9 minutos. O cromatograma da subfração F3 (figura 10) apresentou quatro picos, no tempo 55,7, 56,1 57,0 e 60,9 minutos. A subfração F4 (figura 11) obteve três picos no tempo de retenção de 13,6, 35,5 e 57,0 minutos. A subfração F5 (figura 12) apresentou um pico majoritário no tempo de retenção de 5,5 minutos. O cromatograma da subfração F6 (figura 13) apresentou dois picos, no tempo 5,6 e 60,9 minutos. O cromatograma do branco do meio apresentou diversos picos conforme pode ser observado na figura 14.

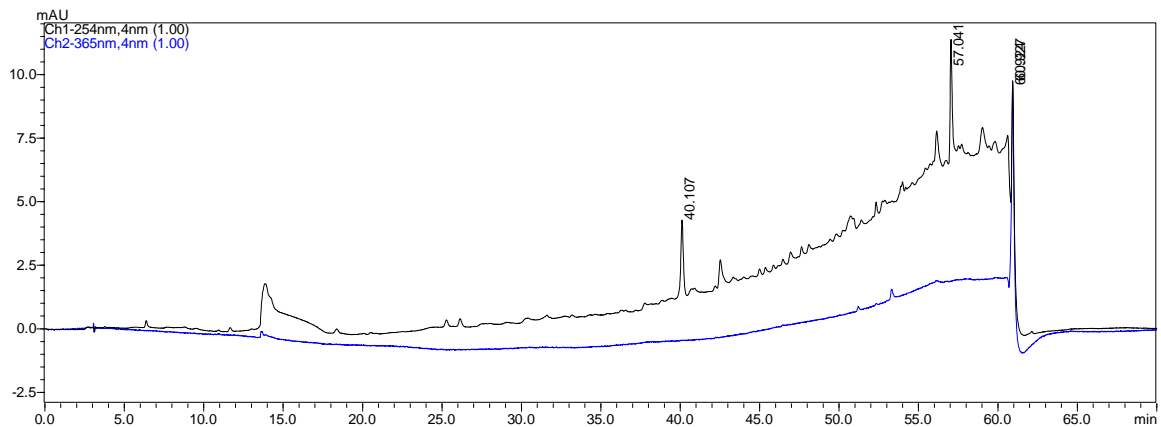


Figura 8: Análise do perfil cromatográfico da subfração F1 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada em sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min..

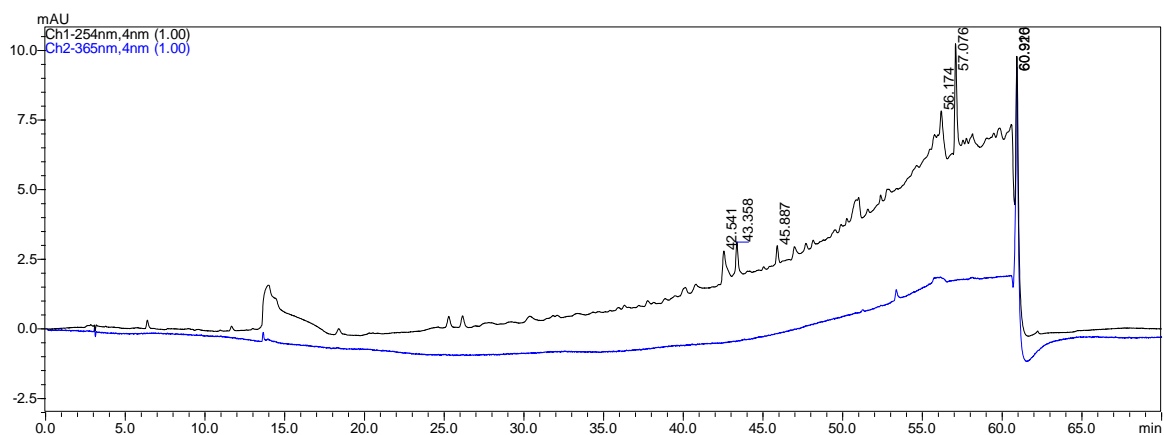


Figura 9: Análise do perfil cromatográfico da subfração F2 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada em sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min..

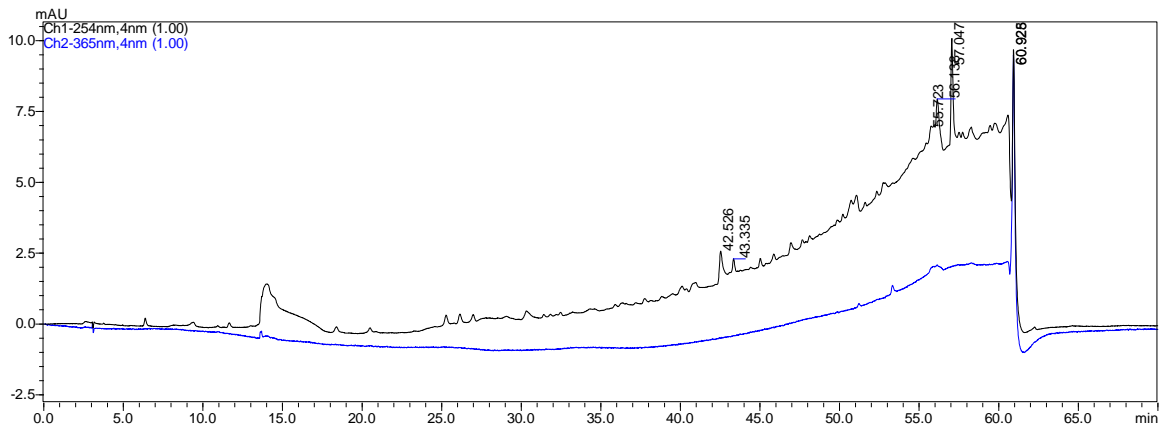


Figura 10: Análise do perfil cromatográfico da subfração F3 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada em sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min

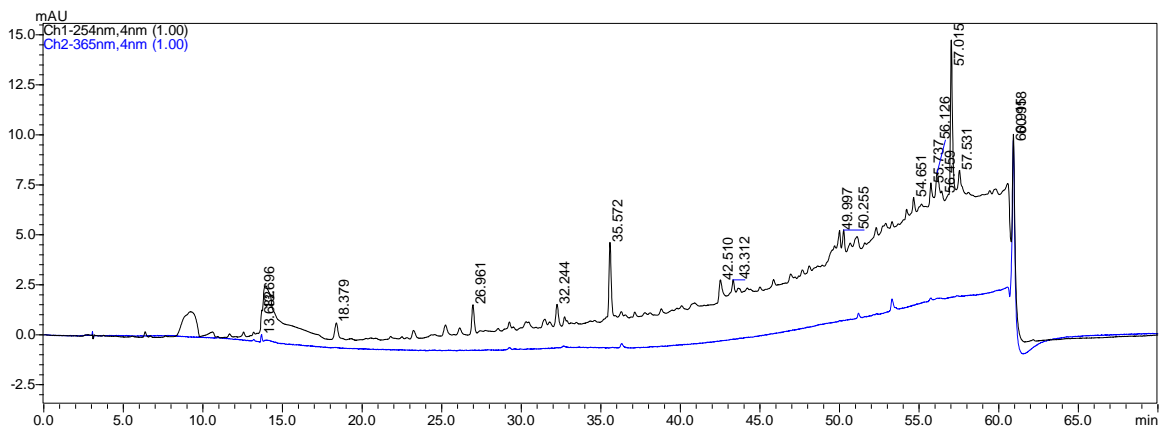


Figura 11: Análise do perfil cromatográfico da subfração F4 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada em sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min

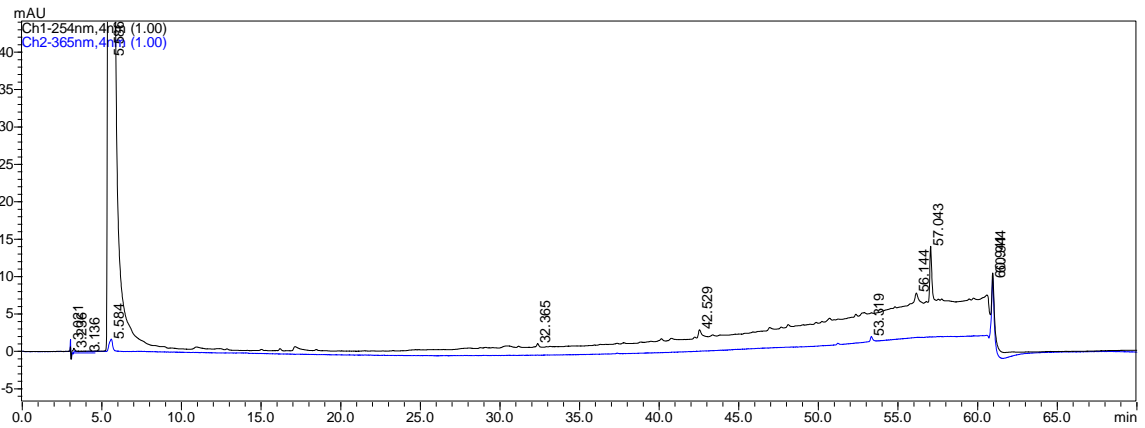


Figura 12: Análise do perfil cromatográfico da subfração F5 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min.

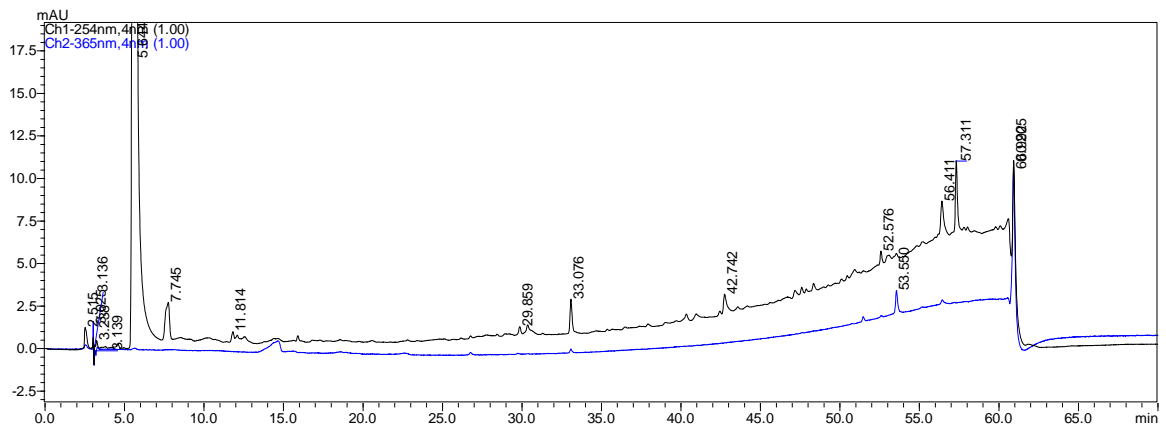


Figura 13: Análise do perfil cromatográfico da subfração F6 da fração em acetato de etila do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2, realizada sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 20% de metanol e terminando em 95% de metanol em 60 min, injeção de 10 μ L com vazão de 1 mL/min

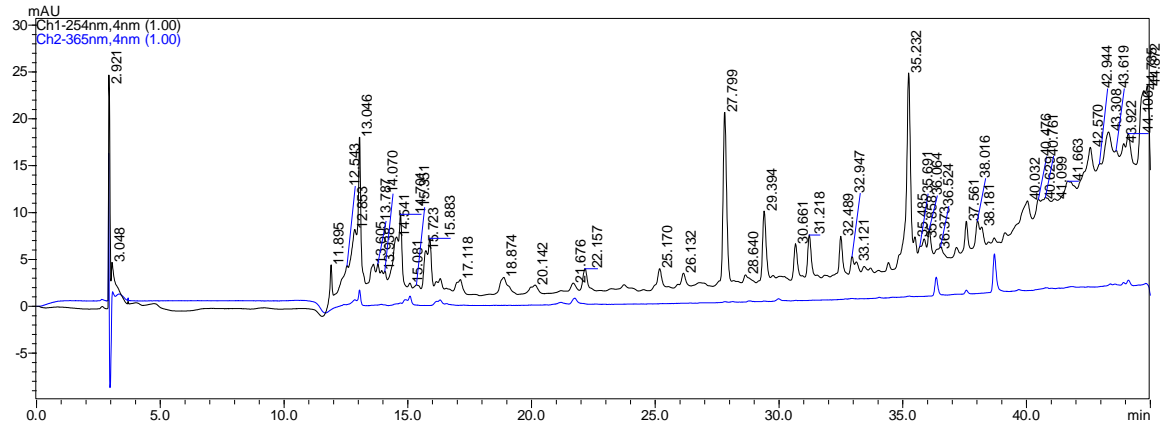
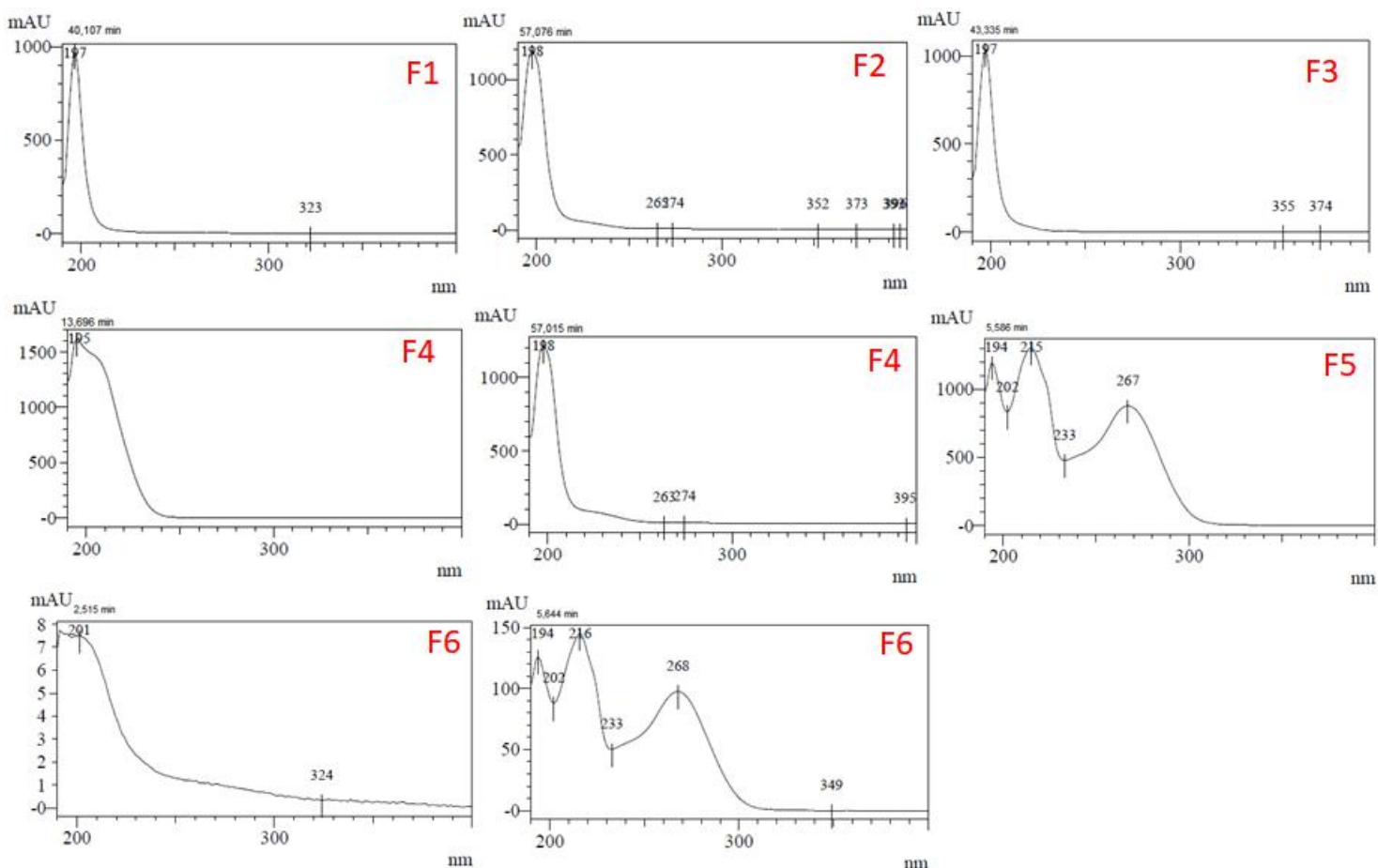


Figura 14: Análise do perfil cromatográfico do branco da cultura do fungo endofítico HB1b2, realizada sistema de fase móvel constituído por solvente A: água ultrapura e B: metanol em gradiente iniciando em 10% de metanol e terminando em 100% de metanol em 45 min, injeção de 100 μ L com vazão de 1 mL/min.

4.3 Espectro de UV das subfrações e branco do arroz.

O espectro UV faz com que observe, na varredura de 200 a 400 nm, comprimentos de onda com maior absorção, conseguindo uma melhor interpretação do sinal cromatográfico. Foram analisados tanto as subfrações do extrato bruto do fungo endofítico HB12b12 (figura 15), quanto o do branco da cultura de arroz (figura 16). As condições de fase móvel para as análises das frações foram iniciando com metanol a 20% e finalizando em 95% com tempo de análise de 65 minutos, já para o branco da cultura de arroz foi iniciado a 10% e finalizado a 100%, com tempo de análise de 45 minutos. Os principais espectros das subfrações foram demonstrados na figura 16, onde a subfração F2 apresentou banda no comprimento 198, nm. A subfração F3 banda no comprimento 197nm. A subfração F4 banda no comprimento 195 nm. A F5 194, 215, 267 e 349 nm e a F6 291 e 324 nm. Já os espectros do branco (Figura 16) referente aos principais picos não apresentaram perfil similar aos observados para as frações do fungo, indicando que as substâncias químicas de interesse nas frações são provenientes de metabólitos secundários do fungo HB12b12



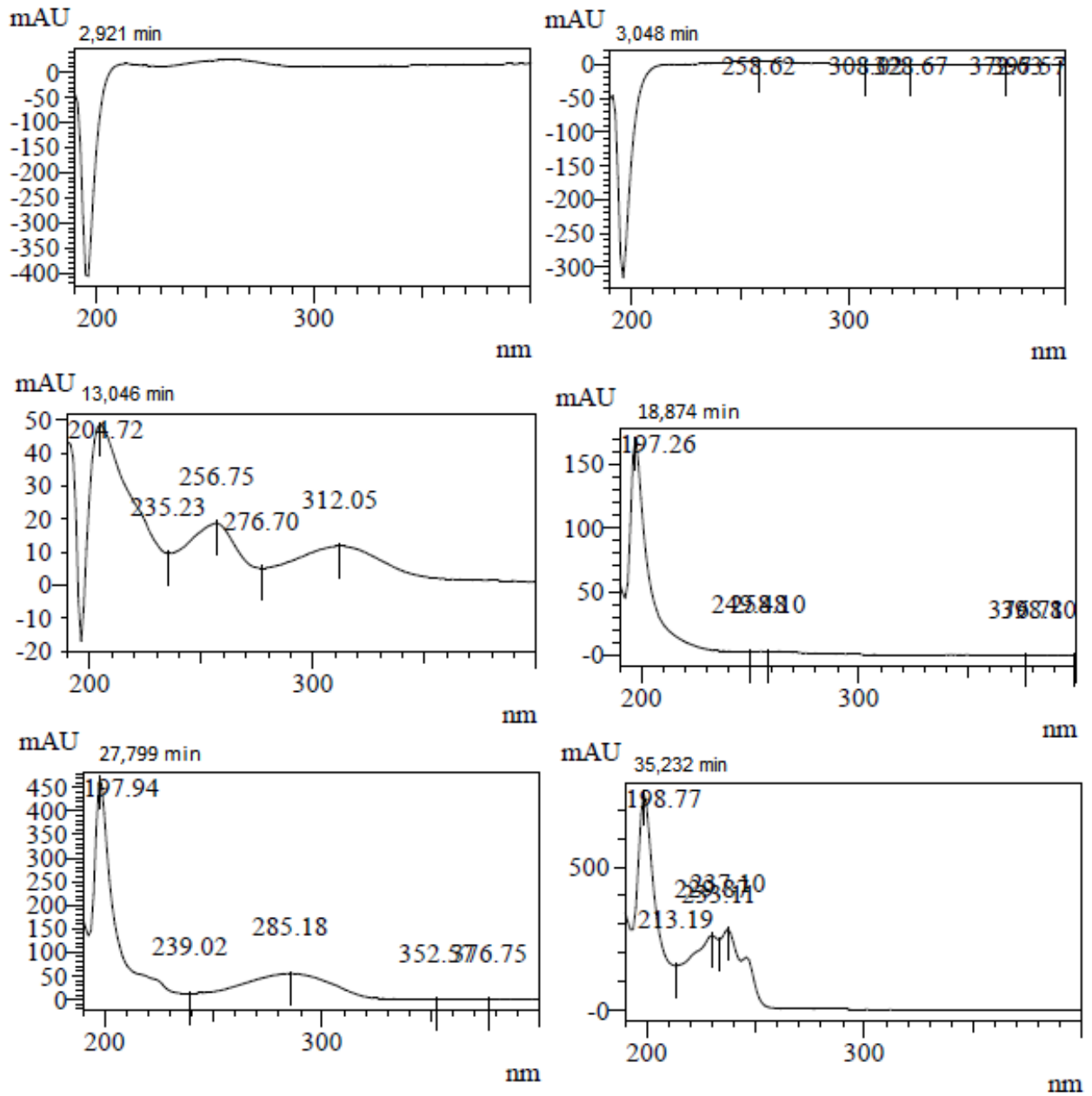


Figura 15: Principais espectros de UV do branco da cultura do fungo endofítico HB12b2

4.4 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto de fungo endofítico Hb12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera*

Para verificar a atividade leishmanicida das subfrações em acetato de etila produzidas foi feito o teste de atividade anti-promastigas de *L. amazonensis* conforme descrito no item 3.9. As concentrações das subfrações utilizadas no ensaio foram 2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. O controle positivo utilizado foi a Anfotericina B a 10 μM , e o controle negativo foram poços não tratados. A atividade anti-*Leishmania* foi expressa através da porcentagem de inibição de crescimento dos parasitos, e a subfração F2 e F3 apresentaram melhor atividade anti-*Leishmania* com IC_{50} 7,71 $\mu\text{g/mL}$ e 18,14 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

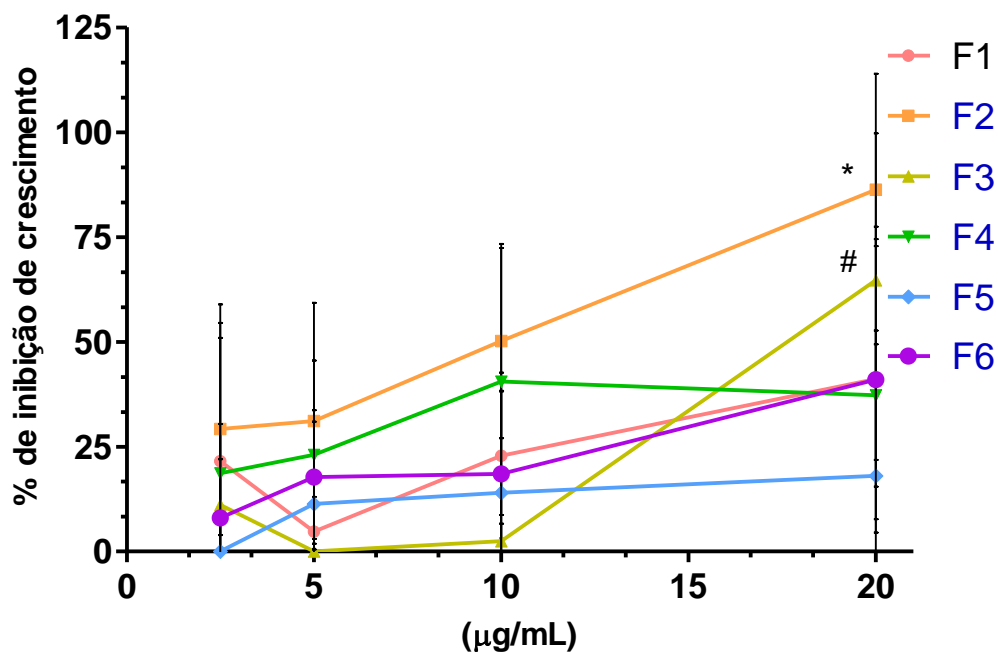


Figura 17: Atividade anti-promastigota das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto do fungo endofítico Hb12b2 de extraído de *Humiria balsamifera*. Promastigotas ($2,5 \times 10^5/\text{poço}$) de *L. amazonensis* foram incubadas com as concentrações indicadas dos extratos ou Anfotericina B (10 μM) durante 48 horas a 26° C. Após incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada através de ensaio colorimétrico de MTT. Média \pm SD. *Comparação entre F2 e controle # comparação entre F3 e controle. $p \leq 0,05$; n=3 em triplicatas.

4.5 Citotoxicidade *in vitro* das subfrações acetato de etila do extrato etanólico bruto do fungo endofítico Hb12b2 em macrófagos RAW 264.7.

A avaliação de possível citotoxicidade causada pelas subfrações de acetato de etila foi feita utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^6 /poço) e as concentrações 5 e 20 $\mu\text{g/mL}$ das subfrações conforme descrito no item 3.10. Poços com macrófagos não tratados foram utilizados como controle negativo (100% de sobrevivência) e Triton 2% foi utilizado como controle positivo (100% de morte). As subfrações F3 e F6 na maior concentração testada (20 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram citotoxicidade significativa com DL_{50} de 5,49 $\mu\text{g/mL}$ e 6,90 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. (figura 18).

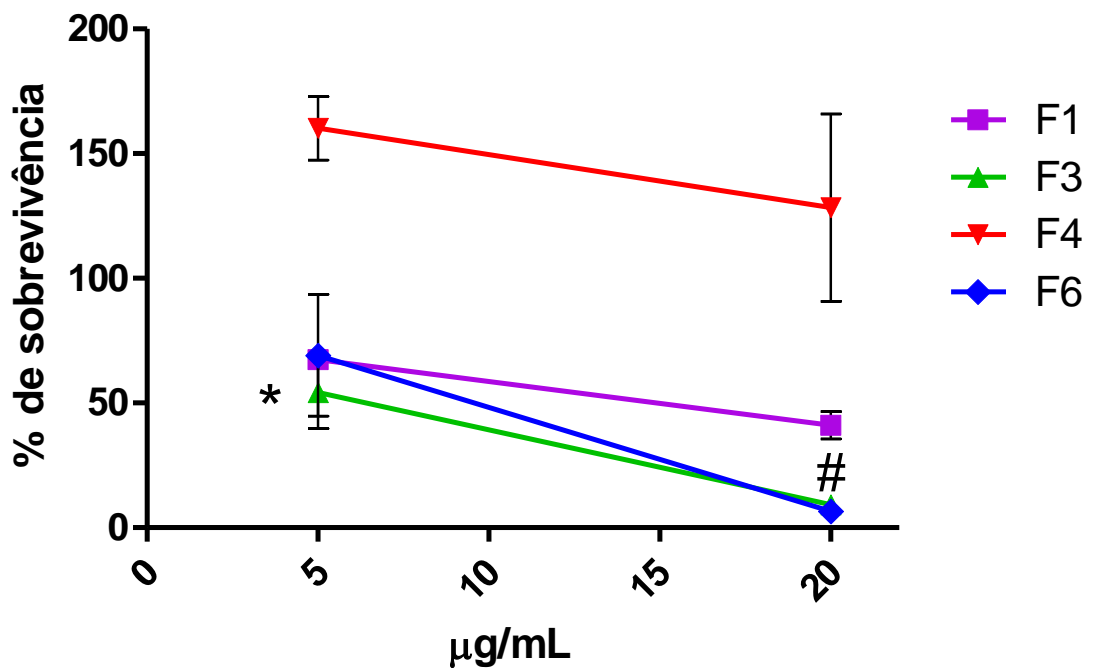


Figura 18: Avaliação da citotoxicidade induzida pelas subfrações acetato de etila do fungo endofítico HB12b2 em macrófagos RAW164,7, nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$. Macrófagos em repouso por 24 horas a 37° C/5% CO_2 foram tratados com as concentrações indicadas do extrato durante 48 horas a 37° C/5% CO_2 . A viabilidade das células foi avaliada através de ensaio colorimétrico de MTT. *Comparação entre não tratado e F3 na menor e maior concentração $p \leq 0,01$; # comparação entre não tratado e F6 $p \leq 0,01$; n=2 em triplicatas

4.6 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* das frações da planta *Humiria balsamifera*

Conforme descrito no estado da arte (ROCHA, 2016) e no item 1.12, extratos feitos a partir do fungo endofítico HB12b2 isolado da planta *Humiria balsamifera* apresentaram efeito anti-*Leishmania*. Então, avaliou-se uma possível correlação dessa atividade com a planta diretamente, utilizando as frações decocto, acetato de etila, diclorometano e butanólica da *Humiria balsamifera*, nas concentrações 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio anti-promastigota conforme descrito no item 3.9. Anfotericina B foi usada como controle positivo na concentração de 10 μM . Nenhuma das frações testadas apresentaram ação antiparasitária. (figura 19).

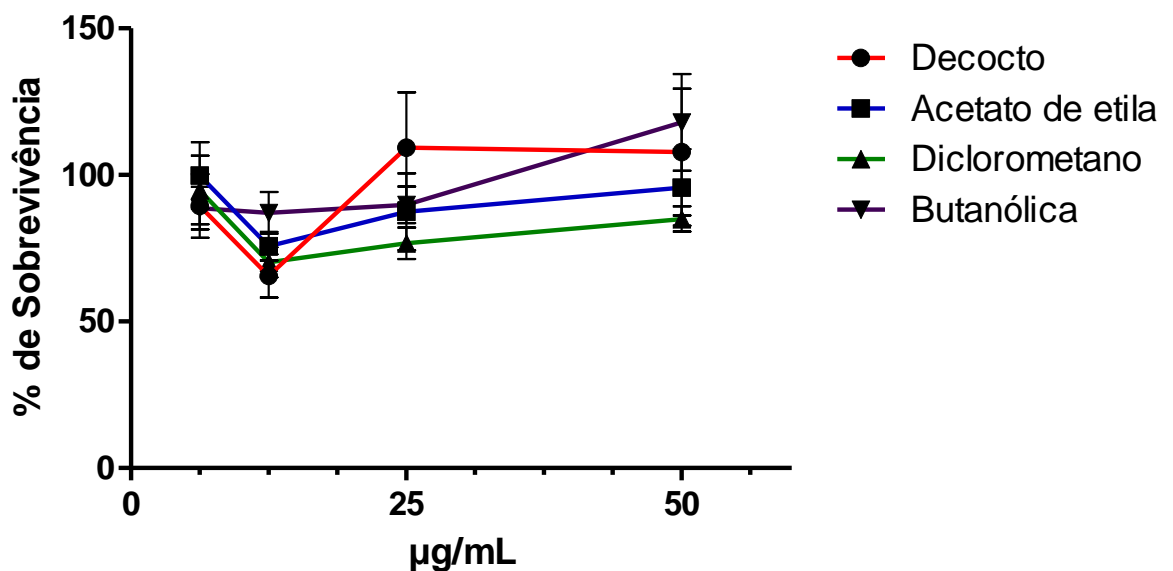


Figura 19: Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* de frações da planta *Humiria balsamifera*. Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 /poço) foram incubadas com concentrações indicadas dos extratos durante 48 horas a 26° C. Após incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada através de ensaio colorimétrico de MTT. Média \pm SD. $p > 0,05$. N=3 em triplicata

5 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças endêmicas principalmente nos países com clima tropical, como exemplo os países da América do Sul. Dentre esses países, o Brasil é o que possui uma taxa de letalidade expressiva (PAHO,2018). Os tratamentos existentes são administrados por um longo período e com efeitos colaterais graves, o que dificulta a adesão do paciente. Os principais fármacos utilizados são: anfotericina B, antimoniato de metilglucamina e pentamidina (BRASIL, 2011). Compostos isolados de produtos naturais possuem substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Esses produtos naturais servem muitas das vezes como bases para produção de derivados sintéticos. Produtos Naturais dão origem a extratos que possuem metabólitos secundários, gerados a partir da interação com meio ambiente ou outras espécies (WAGENAAR, 2008). Diversos metabólitos extraídos de produtos naturais já foram descritos na literatura por possuírem uma ação em *Leishmania* spp., em ambas as formas evolutivas do parasito. (BEKHIT et al. 2018).

É pressuposto que existem mais de 1,5 milhões de fungos na terra, mas grande parte desses fungos ainda não foram descritos. A descrição desses fungos é de grande importância, pois além de expandir a coleção micológica e descobrir sobre a biodiversidade microbiana, esses organismos podem ser promissores para melhorar o aprendizado com questões da medicina e agricultura, dentre outros (TAKAHASHI et al.,2017). O presente estudo foi baseado em um estudo anterior do grupo, onde foi utilizado extrato bruto do fungo endofítico extraído da planta *Humiria balsamifera*. Planta que foi coletada na restinga de Jurubatiba, para avaliar o potencial leishmanicida. O extrato HB12b2 foi ativo contra cepa de *Leishmania amazonensis* com IC₅₀ 10 ug/mL no ensaio anti-promastigota e IC₅₀ 1,8 ug/mL no ensaio antiamastigota. Mas o extrato bruto também apresentou citotoxicidade celular elevada nas maiores concentrações testadas (ROCHA, 2016). A alternativa proposta para melhorar o perfil da citotoxicidade foi o fracionamento do extrato etanólico HB12b2, em busca de extratos menos complexos.

Para identificar os constituintes químicos ou torná-los menos complexos é necessário uso de métodos de purificação. A extração consiste em uma técnica físico-química de transferência de massa através do contato dessa massa que possui sólidos solúveis e voláteis, com solventes. Vários fatores devem ser considerados para a escolha do método, incluindo origem do extrato, seletividade, tempo e recursos disponíveis. (NEWMAN; CRAGG, 2016). Então, primeiramente o extrato bruto HB12b2 passou por um fracionamento, que foi iniciado

com a dissolução 2,37 g do extrato bruto utilizando metanol e água. Após isso foi iniciada a partição líquido-líquido, com três solventes diferentes: hexano, acetato de etila e butanol. Ao final dessa etapa foram obtidas 3 frações distintas: a de hexano com massa de 0,05 g, a de acetato de etila com massa de 0,148 g e a de butanol com massa de 0,493 g. O rendimento foi de 6,2 % da fração de acetato de etila, 20,8% da fração butanólica e 2,1% da fração hexânica. Na literatura, frações com rendimentos similares foram obtidos da espécie vegetal *Senecio desiderabilis*, após fracionamento utilizando diclorometano (DEUSCHLE et al,2007).

Com auxílio da análise fitoquímica utilizando CCD (Cromatografia em Camada Delgada) na fração de acetato de etila, foram identificadas 5 bandas com polaridades diferentes, dando início então a Cromatografia em Coluna em Sílica Gel para aumentar o grau de pureza do fracionamento. Após eluição dos solventes foram coletadas 50 amostras. A análise prévia das 50 amostras foi feita utilizando CCD e elas foram reunidas pelas suas semelhanças no perfil de polaridade, produzindo então 6 subfrações menos complexas com substâncias de polaridades diferentes. As subfrações foram divididas, pesadas e nomeadas da seguinte maneira: 7,5 mg (Fração 1 - F1), 1 mg (Fração 2 - F2), 5,2 mg (Fração 3 - F3), 3,1 mg (Fração 4 - F4), 6,4 mg (Fração 5 - F5) e 10,1 mg (Fração 6 - F6). Na literatura esse método de separação é bastante utilizado, como no caso de fungos filamentosos isolados na Antártica, onde foram produzidos extratos e avaliado a atividade antibacteriana em *Xanthomonas* spp. Os extratos que apresentaram melhores atividades foram selecionados para purificação utilizando método de cromatografia em fase normal onde o extrato bruto inicial com 90 mg, e após o fracionamento as frações foram coletadas e agrupadas de acordo com a similaridade em CCD e então obtidas 6 frações com massa total de 17,2 mg (VIEIRA, 2018).

Para atingir o sucesso em uma extração devemos nos atentar na seleção, custo da extração, preparação da amostra e revisão dos protocolos apropriados para atingimos rendimentos satisfatórios para análises de possíveis classes a serem encontradas. A complexidade de substâncias presente em uma amostra de produto natural é grande, e a caracterização dessas substâncias requer um eficaz método de análise química refinado (PEZO et al., 2006). Em comparação com o branco do arroz, os cromatogramas das subfrações geradas do fracionamento do extrato bruto do fungo endofítico Hb12b2 possuem alguns pontos que tem tempo de retenção próximos, como a subfração F1 possui um pico no tempo 40,1 min próximo ao pico 35,2 min e 44,8 min do branco do arroz. A subfração F4, que possui um pico no tempo de retenção 13,6 min e 35,5 min., próximo ao pico 13,0 min., 18,8 min. e 27,7 min. do branco do arroz. A subfração F5 possui um pico no tempo 40,1 min. próximo ao pico 44,8 min do branco do arroz. A subfração F6 com pico no tempo 5,5 min e a subfração F6 5,6 min, próximo

ao pico no tempo 2,9 min do branco do arroz. Foram analisados os principais espectros de UV no comprimento de 200 a 400 nm, onde a subfração F2 apresentou banda no comprimento 198 nm. A subfração F3 banda no comprimento 197 nm. A subfração F4 banda no comprimento 195 nm. A F5 194, 215, 267 e 349 nm e a F6 291 e 324 nm. Já os espectros do branco não apresentaram bandas no comprimentos semelhantes aos das subfrações do fungo. Apesar de possuir tempos de retenção similares, os gráficos dos espectros de UV possuem diferenças como mostrado na figura 15 e 16. As diferenças entre os cromatogramas e espectros de UV do branco do arroz e das subfrações sugere que as substâncias detectadas são produtos do metabolismo do fungo HB12b2.

Das subfrações do fungo endofítico Hb12b2 que tiveram sua atividade testada com a cepa Josefa de *Leishmania amazonensis*, as subfrações F2 e F3 apresentaram ação leishmanicida, com valores de IC₅₀ 7,71 µg/mL e 18,14 µg/mL respectivamente (Tabela 3). Na literatura encontramos que outros extratos de fungos apresentaram atividade contra leishmania, como o extrato do fungo *Trichoderma asperelloides*, onde o extrato etanólico produzido a partir da cultura desse fungo apresentou atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, reduzindo a viabilidade do parasito em 30-90%, com IC₅₀ 1,09 ng/mL (LOPES et al., 2020). Um outro exemplo são extratos contendo enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Dichotomophthora portulacae*, que foram submetidos a teste anti-promastigota de *Leishmania amazonensis* reduzindo a viabilidade de para cerca de 60% com IC₅₀ de 0,834 mg/mL (ALVEZ et al., 2018). Um outro caso foi um metabolito de um fungo endofítico, o ácido (9Z, 11E) -13-oxooctadeca-9,11-dienóico obtido do fungo endofítico *Penicillium herquei* cepa BRS2A-AR apresentou ação contra *Leishmania sp.*, com IC₅₀ de 100 µM (HAYIBOR et al., 2019). Segundo a pesquisa realizada utilizando 18-Des-hidroxi Citocalasina, um composto isolado do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum-92C*, apresentou atividade antiparasitária reduzindo a viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com IC₅₀ 9,2 µg/mL, resultado similar ao encontrado nesse trabalho (BRISOW et al., 2017).

Os macrófagos são as células do sistema imune que possuem maior participação no combate desse parasito. De acordo com a polarização da resposta inflamatória o macrófago irá se diferenciar em fenótipos com funções distintas. Ele é responsável pela produção de mecanismo importante contra o parasito, o óxido nítrico, junto com a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são de extrema importância na eliminação de infecções (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Então, é importante que o extrato testado tenha eficácia antileishmani, mas que não apresente toxidez às células. Os resultados de citotoxicidade do nosso estudo demonstraram que, as subfrações F3 e F6 demonstraram induzir

citotoxicidade relevante com DL₅₀ de 5,49 µg/mL e 6,90 µg/mL respectivamente (Tabela 3) em células de linhagem RAW 264.7. Estudos utilizando protocolo semelhante utilizando macrófagos RAW 264.7 demonstraram que constituintes químicos da *Annonaceae* apresentaram citotoxicidade variando de 43,5 a 79,7 µg/mL, e o medicamento padrão, Glucantime, mostrou toxicidade maior que 100 µg/mL (VILA-NOVA et al., 2011). O composto 18-Des-hidroxi Citocalasina isolado do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum-92C* teve sua citotoxicidade testada em linhagem celular de fibroblastos GM07492-A apresentando DL₅₀ 521,3 µg/mL, demonstrando uma citotoxicidade baixa (BRISSOW et al., 2017).

Extratos da planta *Humiria balsamifera* também foram testados para avaliar seus efeitos leishmanicidas. Os extratos foram fornecidos pela Prof^a Denise Guimarães, e as frações testadas foram: decocto, acetato de etila, diclorometano e butanólica. Nenhum dos extratos apresentou ação leishmanicida significativa, descartando alguma correlação entre o efeito produzido pelo fungo endofítico e a planta. Na literatura a mesma planta teve extratos da sua folha testados contra *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária *in vitro*. A fração de acetato de etila apresentou mais atividade antimalárica com IC₅₀ 49,65 mg/mL e a fração em metanol com IC₅₀ 90,28 mg/mL (DA SILVA et al., 2004). Um outro exemplo do uso da planta *Humiria balsamifera* são os extratos produzidos da casca da *Humiria balsamifera* que tiveram suas atividades testadas como larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. Testes mostraram que o extrato em acetato de etila apresentou mortalidade de 84% da cepa de *Aedes aegypti* em 48 horas em concentração de 100µg/mL, com LD₅₀ 49 µg/mL (FALKOWSKI et al., 2020).

Nota-se que ocorreu um aumento nas pesquisas com produtos naturais no sentido de isolar e identificar em extratos bruto qual(is) possível(is) metabólito(s) ou substância(s) responsável(is) pelo efeito biológico (CASANOVA e COSTA, 2017). No entanto como mostrado nesse trabalho a subfração mais pura não foi a que apresentou a melhor ação anti-leishmania. Resultados semelhantes já foram demonstrados anteriormente (VILAS BOAS et al., 2017). Uma possível explicação para este efeito é que a atividade de um extrato pode ser devida ao sinergismo das substâncias presentes nele (CECHINEL e YUNES, 1998), como o óleo essencial de *Tetradenia riparia* em combinação com cetoconazol ou anfotericina B, onde mostrou resultados promissores contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro* (TERRON, 2017). Esse mesmo efeito sinérgico foi observado *in vitro* contra *Leishmania brazilliensis* onde se associou benzilpenicilina e estreptomicina e obteve-se ação melhor em conjunto do que quando utilizados separadamente (MELLO et al., 2010).

Com os resultados obtidos foi possível observar que houve uma diminuição da complexidade das subfrações comparado ao extrato etanólico bruto, com toxicidade e ação

anti-promastigota variando conforme resumido nos dados demonstrados na Tabela 3. A ordem de pureza foi estabelecida através de comparações entre os cromatogramas das subfrações e expresso de forma crescente numérica.

Tabela 3: Dados de pureza, IC₅₀ e DL₅₀ das subfrações do extrato bruto do fungo endofítico HB12b2

| SUBFRAÇÕES | PUREZA | IC ₅₀ (µg/mL) | DL ₅₀ (µg/mL) |
|------------|--------|--------------------------|--------------------------|
| F1 | IV | 34,42 | 12,61 |
| F2 | II | 7,71 | X |
| F3 | III | 18,14 | 5,49 |
| F4 | I | 41,29 | 38,16 |
| F5 | V | 136,0 | 146,1 |
| F6 | V | 31,85 | 6,90 |

Legenda: X= não possui o dado, nível de pureza em ordem crescente, indo de I a V sendo o V mais puro.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões Parciais

1. A metodologia utilizada para o fracionamento foi eficaz, pois chegou a subfrações menos complexas comparadas ao extrato bruto.
2. A subfração F2 foi a que apresentou a melhor atividade anti-promastigota com IC₅₀ de 7,71 µg/mL.
3. As subfrações F3 e F6 apresentaram citotoxicidade significativa, DL₅₀ de 5,49 µg/mL e 6,90 µg/mL, respectivamente.
4. As subfrações F5 e F6 demonstraram um perfil de pureza satisfatório.
5. Os extratos da planta *Humiria balsamifera* não apresentaram atividade anti-promastigota, demonstrando que não há correlação entre o extrato produzido pelo fungo endofítico e a planta.

6.2 Conclusão Geral

O fracionamento do extrato bruto de HB12b2 foi eficiente, mas as frações mais puras não mantiveram o efeito anti-promastigota do extrato bruto. A fração de melhor atividade (F2) apresentou menor pureza, sendo necessários estudos adicionais para isolamento do produto ativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-MOORE J. P.; GANGNEUX P. J.; PAPPAS G. P. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **International Society for human and Animal Mycology**, 54, 223-231, 2016

ALVES, D. R. *et al.* Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0196796, 2018.

AMATO V. S. *et al.* Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis?. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.l.], v. 85, n. 5, p. 818-819, 2011.

ATANASOV, A G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AZEVEDO, R. N. **Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos associados à Carapichea ipecacuanha (Rubiaceae)** Dissertação de Mestrado-PPBIOTEC, Universidade Federal de Ouro Preto. 2020.

BASTOS, M. M. *et al.* Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. **Rev Virtual Quim**, v. 8, p. 2072-2104, 2016.

BEKHIT, Adnan A. *et al.* Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European journal of medicinal chemistry**, v. 160, p. 229-244, 2018.

BEN SALAH, A. *et al.* Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 524-532, 2013.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet [Internet]**; 392 (10151): 951-70. 2018.

BRASIL- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade, **Ministério da Saúde**, 2011. p. 54. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. **Secretaria da Vigilância em Saúde**, 2.^a edição atualizada, Brasília – DF, 2017.

BRISSOW, E. R. *et al.* 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of Diaporthe phaseolorum-92C, an endophytic fungus isolated from Combretum lanceolatum Pohl ex Eichler. **Parasitology research**, v. 116, n. 7, p. 1823-1830, 2017.

BRUN, R.; BERENS, R. L.; KRASSNER, S. M. Inhibition of *Leishmania donovani* transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. **Nature**, v. 262, n. 5570, p. 689, 1976.

CARVALHO, S. H. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CDC- **Centers for Disease Control and Prevention**, Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acessado em: 30 de Maio de 2021.

CECHINEL FILHO, V. YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

COURRET, N. *et al.* Kineticsof the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 263-279, 2001.

DA SILVA, T. B. C. *et al.* Chemical constituents and preliminary antimalarial activity of *Humiria balsamifera*. **Pharmaceutical biology**, v. 42, n. 2, p. 94-97, 2004.

DE CARVALHO NÓBREGA, V. S. Fracionamento do extrato metanólico dos galhos de *Eschweilera ovalifolia* (DC.) **Nied.** 2013.

DE SOUZA F. N. *et al* Styrylpyrone, isolated from an Amazon plant, induces cell cycle arrest and autophagy in *Leishmaniaamazonensis*, **Natural Product Research.** 2020

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5 417-423, 1996.

DEUSCHLE, R, AN *et al.* Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 220-223, 2007.

DNDi Leishmanioses – **DNDi América Latina** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>> Acessado em: 16 de Janeiro de 2020

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.

FALKOWSKI, M. *et al.* Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta tropica**, v. 201, p. 105179, 2020.

FLORINDO, R. H. S. **Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à Piper sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce**, Dissertação de mestrado Universidade Federal de Ouro Preto-PPGBIOTEC, Minas Gerais. 2019.

GARCIA, L. P. *et al.* Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Texto para Discussão**, 2011.

GARNHAM, P. C. C. The genus leishmania. Bulletin of the **World Health Organization**, v. 44, n. 4, p. 477, 1971.

HAYIBOR, K *et al.* Ghanaian mangrove wetland endophytic fungus, *Penicillium herquei* strain BRS2A-AR produces (9Z, 11E)-13-oxooctadeca-9, 11-dienoic acid with activity against *Trichomonas mobilensis*. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 1918-1937, 2019.

LAINSON, R. *et al.* The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, Classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. **Peters & Killick Kendrick Eds.** p. 1-119. London: Academic Press, 1987

LI, J. Y. *et al.* Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56, n. 5, p. 463-468, 2001.

LOPES, D. S. *et al.* Ethanolic Extract of the Fungus *Trichoderma asperelloides* Induces Ultrastructural Effects and Death on *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **Brief Research Report**, v. 10, p. 306, 2020.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008

MARINHO, A. M. R. *et al.* Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 280-283, Apr. 2005.

MARQUES, A. M. *et al.* Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. *Journal of Vector Borne Diseases*, **Delhi**, v. 54, n. 1, p. 61–68, 2017

MELLO, C. X. *et al.* Avaliação do efeito dos antimicrobianos benzilpenicilina estreptomicina e flucitosina, no crescimento “in vitro” de *Leishmania braziliensis*. **Analytica**, São Paulo, v. 9, n. 49, p. 72-78, out./nov. 2010.

MORENO, E. *et al.* Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 835–840, 2011.

MOSMANN, T. R.; FONG, T. A. T. Specific assays for cytokine production by T cells. **Journal of immunological methods**, v. 116, n. 2, p. 151-158, 1989

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016

OHZEKI, T.; MORI, K. Synthetic racemate and enantiomers of cytosporone E, a metabolite of an endophytic fungus, show indistinguishably weak antimicrobial activity. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 12, p. 2584-2590, 2003.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Chemical Constituents and Antileishmanial and Antibacterial Activities of Essential Oils from *Scheelea phalerata*. **ACS Omega**, 2020.

OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

PAHO - Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2018, Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5
Acessado em: 30 de junho de 2021.

PAULA, C. D. R. DE *et al.*; A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methylglucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 365–371, jun. 2003.

PEZO, D.; SALAFRANCA, J.; NERIN, C. Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1241-1246, 2006.

PICCICA, M. *et al.* Efficacy and safety of Pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, 2021.

RAMOS, H. P. **Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc.** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de

Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. doi:10.11606/T.60.2013.tde-25062013-160339.

RATH S. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, vol. 26, no. 4, 550-555, 2003

REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

ROCHA, L. Y. **Atividade anti-leishmania amazonensis dos extratos dos fungos endofíticos isolados das plantas Humiria balsamifera e Tocoyena bullata** 2016 49 f. Monografia apresentada ao Curso de Farmácia-UFRJ campus Macaé. Rio de Janeiro, 2016.

RAYCHAUDHURY, B *et al.* Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta tropica**, v. 95, n. 1, p. 1-8, 2005.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual reviews in microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.

SHALEV-BENAMI M. *et al* Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. **Nature communications** 8: 1589, 2017

SILVA, A. R. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 359-368, 1997.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gazeta médica da Bahia**, n. 79, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre: **Bookman (SBQ)**, p. 598-676, 2002.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 40, n. 2, p. 139–149, jun. 2004.

STROBEL, G., B. D., U. C & J. Harper, Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products** 67: 257-268 ,2004.

TAKAHASHI, J. A. *et al.* Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TERRON, M. S. **Atividade anti-Leishmania do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, in vitro**. 2017. Dissertação de Mestrado. Disponível em: < <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/> >1/2012 Universidade Estadual de Maringá, 2017.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.

VIEIRA, G. **Metabólitos secundários de fungos da Antártica com atividade antibacteriana em Xanthomonas spp.** Tese de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (microbiologia aplicada), UNESP-Rio Claro, 2018.

VILA-NOVA, N. S. *et al.* Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567-571, 2011.

VILAS BOAS, D. F. **Isolamento biomonitorado de composto antibacteriano produzido por Streptomyces tubercidicus.** 2017. 66f. Dissertação Mestrado em Inovação Tecnológica - Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2017

WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples—the second generation natural products library at Wyeth. **Molecules**, v. 13, n. 6, p. 1406-1426, 2008.

WEBER, D. *et al.* Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *The Journal of Antibiotics*, v. 57, n. 9, p. 559-563, 2004.

WEI, P. *et al.* Combination therapy with amphotericin B and doxorubicin encapsulated in mannosylated nanomicelles for visceral leishmaniasis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 598, p. 124804, 2020.

WHO, Leishmaniasis Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis:2018. **World Health Organization** Disponível em: http://who-dev.essi.upc.edu/who/Country%20profiles/LEISHMANIASIS_CP_PAHO_BRA_2018_PT.pdf Acessado em: 21 de junho de 2021.

WHO- World Health Organization. Leishmaniasis. **World Health Org FactSheet.2021;375.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. > Acessado em: 19 junho 2021.

XIE P. *et al* Biosynthetic Potential-Based Strain Prioritization for Natural Product Discovery: A Showcase for Diterpenoid-Producing Actinomycetes **Journal of Natural Products**, 77, 377–387, 2014

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 2000.