



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Campus UFRJ-Macaé *Professor Aloísio Teixeira*

Matheus Mendes Geraldino

Avaliação da atividade leishmanicida de produtos bioativos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Leishmania amazonensis*.

MACAÉ/RJ

2022



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Campus UFRJ-Macaé *Professor Aloísio Teixeira*

Matheus Mendes Geraldino

Avaliação da atividade leishmanicida de produtos bioativos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Leishmania amazonensis*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira* como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley.

Coorientadora: Mestre/Doutoranda Arieli Bernardo Portugal.

MACAÉ

2022

CIP - Catalogação na Publicação

G355a

Geraldino, Matheus Mendes

Avaliação da atividade leishmanicida de produtos bioativos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Leishmania amazonensis*. / Matheus Mendes Geraldino. -- Macaé, 2022.

50 f.

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley

Coorientador: Arieli Bernardo Portugal

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, CM UFRJ Macaé, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania. 3. *Beauveria bassiana*. 5. *Metarhizium anisopliae*.
I. Wanderley, João Luiz Mendes, orient. II. Portugal, Arieli Bernardo, coorient. III. Título.

CDD 616.9364

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central - Centro Multidisciplinar UFRJ Macaé
Bibliotecário(a) Rosangela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

MATHEUS MENDES GERALDINO

**Avaliação da atividade leishmanicida de produtos bioativos
dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e
Metarhizium anisopliae em *Leishmania amazonenses***

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para
obtenção do título farmacêutico.

Macaé, 27 de outubro de 2022

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley (Presidente da banca)
Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé
<http://lattes.cnpq.br/0880814184146779>

Prof. Dr. Willian Jonis Andrioli
Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé
<http://lattes.cnpq.br/9247004940826494>

Prof. Dra. Júlia Peralta Gonçalves
Centro Multidisciplinar UFRJ – Macaé
<http://lattes.cnpq.br/7776896862981992>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar comigo e por ter me dado saúde para que o dia de hoje chegasse. Aos meus pais Joanete e Dilene que são a minha base, fizeram meu sonho se tornar realidade, e por mais difícil que tenha sido esse trajeto, com diversas barreiras, nunca descreditaram do meu potencial e sempre me deram força; Às minhas irmãs Josilene, Juliana e Xayah que sempre me apoiaram desde o início, por todo suporte emocional, e por sempre se fazerem presentes mesmo estando longe, me dando toda força necessária em momentos onde achei que não fosse conseguir; Aos meus sobrinhos Maria Luísa, Arthur e Enzo, que são um dos maiores motivos a qual nunca me fizeram sequer pensar em desistir. Amo todos incondicionalmente; meus cunhados Vagner e Thiago, me ajudaram durante todo esse percurso. Eternamente grato; aos meus tios (Ana Maria, Solange e Geisa) e primos (Raylane, João Victor, Natan, Raíssa e Dany), por sempre terem me dado todo apoio e conselhos durante essa jornada que não foi nada fácil. A todos os meus amigos(as) de sala, que fizeram com que todo esse processo de formação se tornasse mais leve. Em especial, a Anna Beatriz, Catherine, Nathália Fialho e Marina, meu grupo desde o 1º período que amo demais e levarei para toda a vida, assim como os demais da sala que amo demais. Grato por sempre ter o apoio de todas as meninas quando mais precisei dentro e fora da faculdade; A Iury Hudson, meu melhor amigo, que sempre esteve boa parte presente mesmo que de longe, me dando forças e ouvindo meus desabaços diários; A Arieli Portugal (co-orientadora) por compartilhar o máximo de seu conhecimento, pelo acolhimento e por sempre ser solícita dentro e fora do laboratório. Eternamente grato por todo o apoio e pela amizade construída; Ao João Wanderley, meu orientador científico, por compartilhar todo seu conhecimento, pela paciência e parceria durante todo o projeto de pesquisa; Thais Berçot Teodoro e o professor Richard Ian Samuels da UENF/CAMPOS-RJ, pelo fornecimento dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para pesquisa; A Denise de Oliveira Guimarães pela parceria no preparo dos extratos dos fungos; Pibic/UFRJ, por contribuir financeiramente, aprimorando meus estudos durante todo o projeto de iniciação científica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo Biológico da <i>Leishmania spp.</i>	13
Figura 2: Casos de leishmaniose Visceral no mundo em 2020.....	15
Figura 3: Manifestação clínica período final da LV.....	16
Figura 4: Casos de leishmaniose Tegumentar no mundo em 2020.....	17
Figura 5: Manifestação clínica de LT.....	18
Figura 6: Estrutura Química do antimoniato de metilglucamina	19
Figura 7: Estrutura Química da pentamidina.....	20
Figura 8: Estrutura Química da anfotericina B.....	21
Figura 9: Estrutura Química da paromomicina.....	22
Figura 10: Estrutura Química da miltefosina.....	23
Figura 11: <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
Figura 12: <i>Beauveria bassiana</i>	26
Figura 13: Filtração simples.....	30
Figura 14: Ar comprimido.....	30
Figura 15: Partição Líquido-Líquido.....	31
Figura 16: Ar comprimido.....	31
Figura 17: Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> da fração obtida em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
Figura 18: Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> do extrato bruto etanólico dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pesagem da massa micelial dos fungos.....	33
Tabela 2: Rendimento dos fungos por filtração simples etanólica 99,8% P.A.....	34
Tabela 3: Cálculo do rendimento dos extratos etanólicos.....	35
Tabela 4: Pesagem da fração do sobrenadante da cultura dos fungos obtida em Acetato de etila.....	36
Tabela 5: Cálculo do rendimento das frações em Acetato de etila.....	37

LISTA DE ABREVIações

B - *Beauveria*

CL₅₀ - Concentração letal

L - *Leishmania*

LC - leishmaniose cutânea

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LCL - leishmaniose cutânea localizada

LCM - leishmaniose mucocutânea

LT - leishmaniose tegumentar

LV - leishmaniose visceral

M - *Metarhizium*

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

OMS - Organização Mundial de Saúde

PSG - *promastigote secretory gel*

RPM - Rotação por minuto

SUS - Sistema único de saúde

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense

V - *Viannia*

T - *Trypanosoma*

TL₅₀ - Tempo letal

SUMÁRIO

Conteúdo

AGRADECIMENTOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIações

RESUMO

1. INTRODUÇÃO

1.1 <i>Leishmania</i> spp e leishmaniose.	12
1.1.1 Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i> spp	12
1.1.2 Formas clínicas e epidemiologia	14
1.1.3 Leishmaniose Visceral	14
1.1.4 Leishmaniose Tegumentar	16
1.2 Tratamento da Leishmaniose	18
1.2.1 Antimoniais Pentavalentes	18
1.2.2 Pentamidina	20
1.2.3 Anfotericina B	20
1.2.4 Paromomicina	22
1.2.5 Miltefosina	23
1.3 Produtos naturais no tratamento da Leishmaniose	24
1.4 Fungos Entomopatogênicos	25
1.4.1 Fungos entomopatogênicos e sua relação com vetores de doenças infecciosas	26

JUSTIFICATIVA

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal	28
2.2 Objetivo específico	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Cultivo dos fungos	29
3.1.1 Métodos utilizados na extração dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> para obtenção dos extratos brutos	29
3.2- Parasitos	31
3.2.1 - Atividade anti-promastigota	32
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS	
5.1 Rendimento dos extratos brutos obtidos dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> por filtração simples em meio etanólico 99,8% P.A.	33
5.2 Rendimento da fração dos sobrenadantes obtidos dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> por partição líquido-líquido.	35
5.3 Atividade anti-promastigota de <i>L. amazonensis</i> da fração obtidas em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> .	37
6. DISCUSSÃO	
7. CONCLUSÃO	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

RESUMO

Introdução: A leishmaniose é uma doença negligenciada, caracterizada pelo conjunto de manifestações clínicas ocasionadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Pode se manifestar nas formas tegumentar ou visceral, de acordo com a espécie de parasito envolvida e das condições do hospedeiro. A transmissão é feita por insetos vetores do gênero *Lutzomyia*, que transmitem formas promastigotas para o hospedeiro humano. Estas formas infectam células fagocíticas e diferenciam em amastigotas, parasitos intracelulares obrigatórios que estabelecem a doença. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira linha para o tratamento da doença. Possuem alta toxicidade e requerem longos períodos de tratamento, além da necessidade de administração intralesional que gera desconforto ao paciente. O medicamento de segunda escolha é a Anfotericina B, produto natural derivado de bactérias da espécie *Streptomyces nodosus*. Tem maior afinidade pelo ergosterol presente na membrana de fungos e protozoários, mas devido a sua afinidade intermediária com colesterol causa dano hepático e renal. Diversos produtos naturais bioativos têm sido avaliados no controle da infecção por *Leishmania*. Há relatos de classes distintas de moléculas bioativas de origem vegetal e fúngica que apresentam atividade leishmanicida ou induzem a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e células epiteliais, ocasionando a diminuição de parasitos diretamente ou em associação com outros fármacos. **Objetivo:** Determinar a atividade leishmanicida de produtos bioativos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Estas espécies fúngicas são capazes de infectar vetores de doenças parasitárias, interferindo no ciclo infeccioso do agente etiológico. **Materiais e métodos:** Os fungos foram cultivados para obtenção da massa micelial e material secretado no sobrenadante da cultura. Foi obtido um extrato bruto através da extração etanólica da massa micelial por filtração simples. O sobrenadante foi extraído por partição líquido-líquido em acetato de etila. A atividade anti promastigota foi avaliada através do ensaio de MTT. **Resultados:** O rendimento de extração etanólica da massa micelial obtida das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi respectivamente 6,8 (107,7 mg peso final) e 8,3% (247,2 mg de peso final). Nas frações obtidas em acetato de etila de produtos bioativos secretados no sobrenadante das culturas, o rendimento foi mais baixo, respectivamente 0,004% (13,8 mg de peso final) e 0,007% (21,8 mg de peso final). O produto obtido na fração em acetato de etila do *M. anisopliae* apresentou melhor atividade leishmanicida, com concentração inibitória (IC₅₀) de 140,2 µg/mL. Os outros três extratos testados apresentaram atividade leishmanicida, porém, apenas nas concentrações mais altas, de 160 e 80 µg/mL. Nesses casos não foi possível definir o IC₅₀ nos testes realizados, pois a análise estatística se apresentou ambígua. **Conclusão:** Observamos atividade tóxica em promastigotas de *L. amazonensis* tanto nos extratos da massa micelial quanto do material secretado em ambas as espécies fúngicas testadas. No entanto, a fração do material secretado na cultura da espécie *M. anisopliae* em acetato de etila apresentou maior atividade leishmanicida. Estes testes indicam que estas espécies fúngicas podem ser fonte de produtos bioativos com atividade leishmanicida, sendo necessários mais estudos de subfracionamento, toxicidade em células de mamíferos e atividade anti-amastigota.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania*; doença; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp e leishmaniose.

O gênero *Leishmania* compreende protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae (GARNHAM, 1971). Algumas espécies são parasitas intracelulares, capazes de serem transmitidas por insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. As manifestações clínicas podem ser apresentadas em três tipos: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose visceral (LV) ou leishmaniose mucocutânea (LMC) (ZILBERSTEIN, 2021). De acordo com a OMS, as leishmanioses são consideradas como uma doença tropical altamente negligenciada, acarretando diversos problemas de saúde, possuindo uma extrema sobrecarga econômica e social para o mundo. Sabe-se que essa doença é endêmica em 98 países e cerca de aproximadamente 350 milhões de pessoas estão suscetíveis à doença (LOPES *et al.*, 2021; GHORBANI e FARHOUDI, 2018).

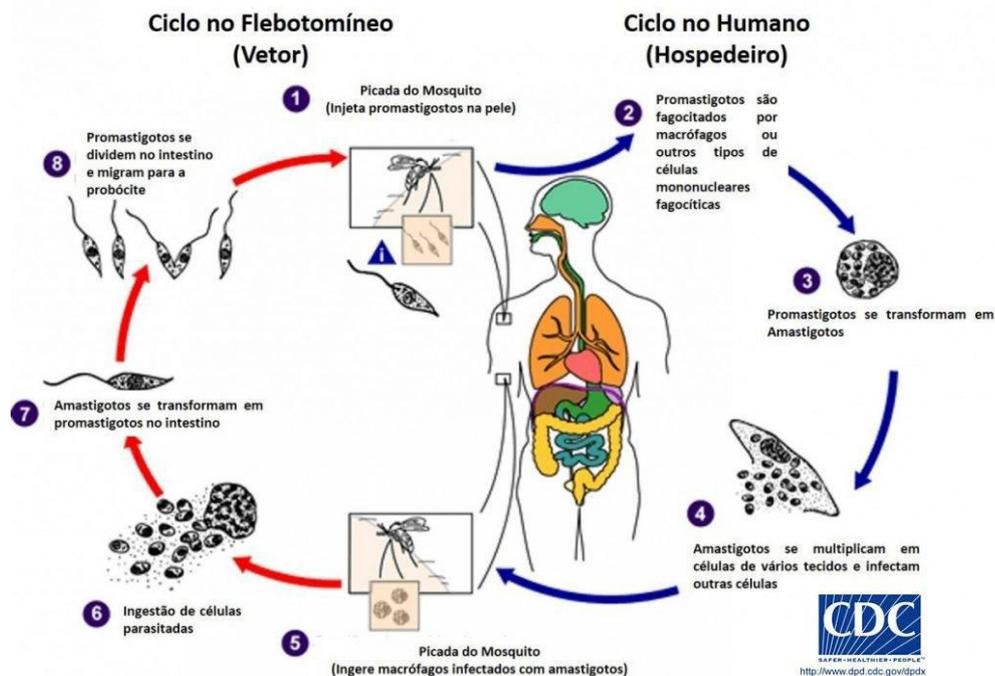
1.1.1 Ciclo Biológico da *Leishmania* spp

A *Leishmania* é um protozoário que apresenta duas principais formas evolutivas: amastigota e promastigota. Elas se diferem estruturalmente e bioquimicamente, possuindo alta capacidade de infectar diferentes hospedeiros e habitar em ambientes celulares distintos (BRUN, 1976; GARNHAM, 1971). A forma promastigota é alongada, extracelular, com flagelo aparente na região anterior, possui motilidade e prolifera no interior do intestino do inseto vetor. Já a forma amastigota é parasito intracelular obrigatório de células fagocíticas no hospedeiro vertebrado. Possui o corpo arredondado, possui flagelo não aparente e não apresenta motilidade e prolifera no interior de fagolisossomos denominado de vacúolos parasitóforos, preferencialmente em macrófagos (GLUENZ *et al.*, 2010; SACKS, 2001).

No ciclo (figura 1), a fêmea do flebotomíneo realiza a hematofagia (etapa 5), sugando macrófagos parasitados. No intestino do inseto os macrófagos se rompem e as amastigotas são liberadas, diferenciando em promastigotas (GARNHAM, 1971). No trato intestinal, os parasitos passam por metaciclogênese: o processo pelo qual

são geradas as formas promastigotas metacíclicas, formas infectivas para células do hospedeiro vertebrado (SACKS, 1984). Essas formas migram para a região anterior do trato intestinal do inseto, onde são sequestradas em um gel glicoconjugado produzido pelo próprio parasita denominado PSG (*promastigote secretory gel*) (ROGERS, 2002). O PSG bloqueia as válvulas cardíacas, impedindo a deglutição dos insetos vetores. Consequentemente, em um novo repasto sanguíneo, as formas metacíclicas são regurgitadas no local da picada do flebotomíneo e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado (STIERHOF, 1999; SACKS, 2001). Após a infecção de um hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células fagocíticas, que podem ser macrófagos residentes, neutrófilos, células dendríticas e monócitos que migram da corrente sanguínea para o local da infecção. Dentro do fagolisossomo ocorre um processo de diferenciação morfológica de promastigotas para amastigotas, que pode levar de 1 a 5 dias, no caso da espécie *Leishmania amazonensis* (COURRET, 2001).

Figura 1:



Ciclo Biológico da *Leishmania* spp. (adaptado de CDC, 2022).

1.1.2 Formas clínicas e epidemiologia

Existem duas principais formas de manifestações clínicas, a Leishmaniose tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV) (DESJEUX, 1996). As mesmas configuram um problema de saúde pública em aproximadamente 98 países, distribuídos na Ásia, Europa, África e Américas (BRASIL, 2017). Existem cerca de 12 milhões de pessoas infectadas, sendo de 0,9 a 1,6 milhão de casos novos no mundo anualmente e 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas com risco de infecção (WHO, [s.d]; OPAS, 2021). Dentre os países das Américas, o Brasil é o país que possui o maior índice de novos casos de LT e LV.

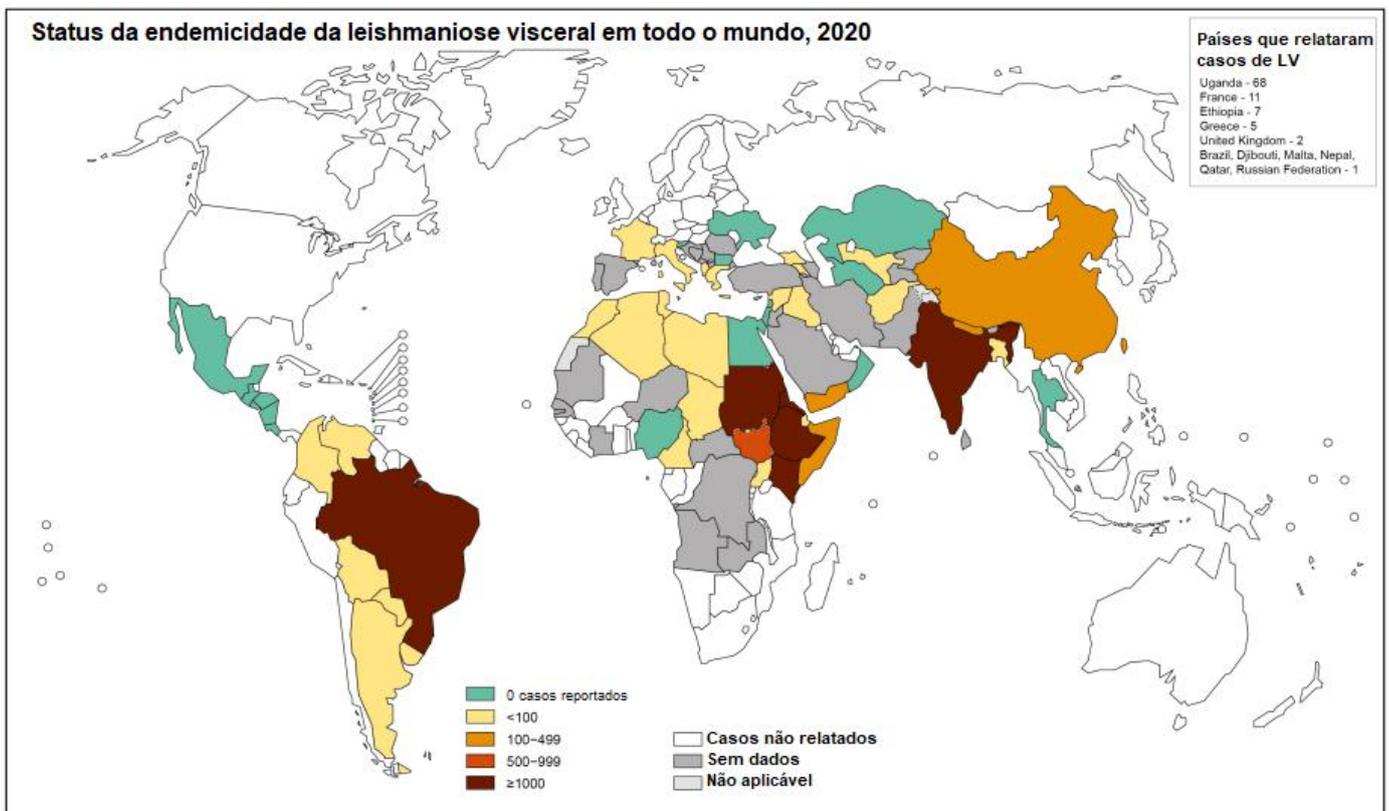
No Brasil, devido a pandemia de COVID-19, as ações de vigilância e controle das doenças foram diretamente afetadas, com isso houve uma pequena queda nos casos de LT de 5%, comparado ao ano de 2019, onde em 2020 foi registrado o menor número de infectados (39.705). Já a LV teve uma queda nos casos notificados em 25% comparada ao ano de 2019, onde no ano de 2020 foram registrados 670 novos casos. É evidente que houve um impacto diretamente da pandemia COVID-19 nas ações de busca ativa, detecção precoce e tratamento de casos, como por exemplo, as atividades de campo (OPAS, 2021).

1.1.3 Leishmaniose Visceral

A LV é uma doença parasitária infecciosa causada pelas espécies *Leishmania donovani* no antigo mundo (Europa) e *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) no novo mundo (Américas), mais em regiões tropicais e subtropicais (OPAS, 2021; VAN e DIRO, 2012). Em média mais de 80 países, entre eles a África, Ásia Oriental e América do Sul, apresentam relatos de casos por LV (figura 2). Geralmente as pessoas que sofrem com a LV se encontram em locais sem saneamento básico, de alta precariedade onde a situação socioeconômica é extremamente baixa. É de conhecimento que, os países que possuem o maior número de casos de acordo com o *ranking* são: Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão do Sul, Somália e Sudão (DNDI, 2020).

A forma clínica da LV (figura 3) é crônica e possui uma alta incidência e mortalidade em crianças com até 5 anos de idade, acometendo principalmente o fígado e o baço, levando a hepatoesplenomegalia. Isto ocorre quando o parasito se dissemina pela via linfo hematogênica, se estabelecendo em determinados órgãos que possuem alta concentração de macrófagos, sendo eles: o fígado, baço, medula óssea e linfonodos, consequentemente ocasionando o aumento do tamanho destes órgãos (BRASIL, 2006; OPAS, 2021). Em média 3.500 casos de LV são notificados a cada ano, possuindo uma taxa média de mortalidade de 7%, e cerca de 90% dos casos podem ser levados a óbito caso o tratamento adequado não seja realizado (OPAS, 2021).

Figura 2:



Casos de leishmaniose visceral no mundo em 2020 (adaptado de WHO, 2022)

Figura 3: manifestação clínica período final da LV - caracterizada por emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia.



Fonte: (MDS, 2014)

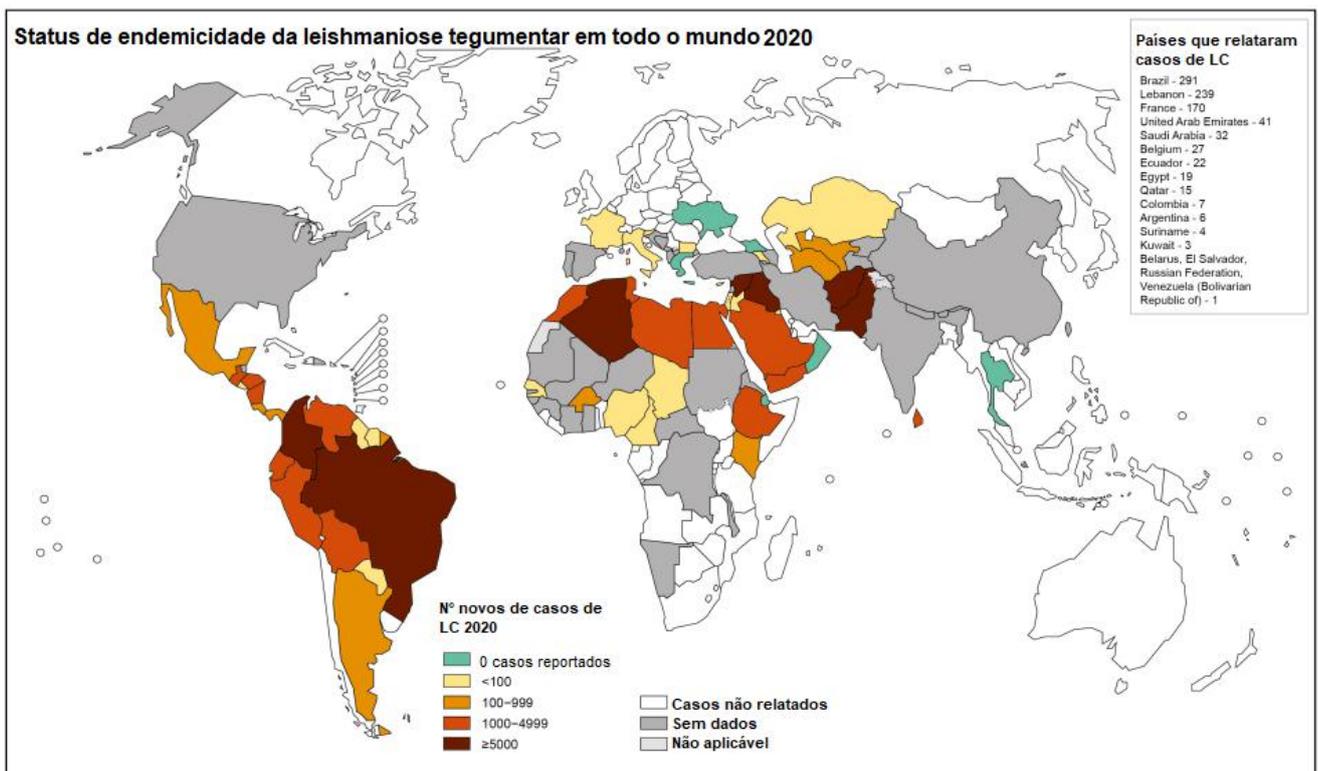
1.1.4 Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT), é uma doença parasitária infecciosa pouco letal e não contagiosa. Sua transmissão ocorre através de vetores (*flebotomínios*) que estão infectados por diferentes espécies da *Leishmania spp.* (OPAS, 2021; VASCONCELOS, 2018). Em todo o mundo, existem cerca de 22 espécies que são patogênicas aos humanos. Nas Américas, cerca de 15 espécies são responsáveis por causar a infecção em humanos, elas estão associadas a 2 subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As principais do subgênero *Leishmania* são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis*, e a do subgênero *Viannia* são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* (OPAS, 2021).

A LT pode ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL) (figura 5), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose mucocutânea (LM) (GOTO, 2012). Na LCL as lesões formadas atingem principalmente a pele, são indolores, possuem formato arredondado ou oval, com bordas vermelhas e elevadas ocorrendo geralmente do local da picada

ou outros locais próximos (BRASIL, 2007). A espécie *L. amazonensis* é a principal causadora de leishmaniose cutânea difusa e disseminada, formas tegumentares mais graves, decorrentes da disseminação do parasito. A leishmaniose tegumentar é um problema de saúde pública em diversos países, principalmente os que apresentam clima tropical. A leishmaniose tegumentar ocorre em 88 países e em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) (figura 4) (BRASIL, 2007).

Figura 4:



Casos de leishmaniose Tegumentar no mundo em 2020 (adaptado de WHO, 2022).

Figura 5: Manifestação clínica de LT - Lesão ulcerada, arredondada com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.



Fonte: (MDS, 2017)

1.2 Tratamento da Leishmaniose

Atualmente, existem poucos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da leishmaniose. Os principais medicamentos são os antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, paromomicina e a miltefosina. Mesmo tendo a disponibilidade desses medicamentos, as ferramentas terapêuticas atuais não são suficientes e isso está diretamente correlacionado com a má adesão à terapia medicamentosa. Os tratamentos atuais possuem uma toxicidade considerável, pois geram diversos efeitos adversos, facilitando o abandono do tratamento pelos pacientes. Além disso, alguns farmacos são administrados na forma injetável e intralesional por longos períodos, gerando dor, desconforto e em algumas situações, necessidade de internação (GHORBANI e FARHOUDI, 2018; RATH *et al.*, 2003).

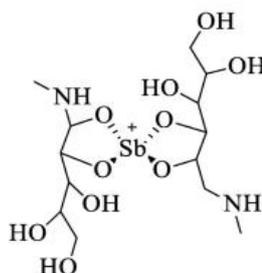
1.2.1 Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes são medicamentos de primeira linha recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil é utilizado o antimoniato de metilglucamina, um composto sintético proveniente do ácido antimônico e da N-metil- glucamina (figura 6), eficaz para o tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (CARVALHO *et al.*, 2019; RATH *et*

al., 2003). Sua via de administração mais utilizada é parenteral, porém, também é administrada intralésional, sendo muito utilizada na leishmaniose visceral por muito tempo (MINODIER e PAROLA, 2007). Há uma hipótese de que a destruição da forma amastigota do parasito acontece através da inibição de determinadas enzimas, como a tripanotona redutase, enzima na qual o parasito necessita para a sua sobrevivência (SOARES *et al.*, 2004). A outra hipótese é de que a enzima superóxido dismutase é inibida, resultando no aumento dos níveis de radicais superóxido, conseqüentemente levando à morte do parasito (RAYCHAUDHURY *et al.*, 2005).

Entretanto, mesmo sendo a medicação mais utilizada nos dias de hoje, o medicamento ainda é muito discutido por possuir uma baixa adesão, possuir alta toxicidade, e por ocasionar diversos efeitos adversos gerando respostas indesejadas durante o tratamento como: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, herpes zoster e insuficiência renal aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017); e principalmente sobre a sua via de administração que gera certo desconforto para os pacientes. Esses fatores indesejáveis ocasionam sérios desafios para a continuidade do seu uso no tratamento da leishmaniose (MINODIER e PAROLA, 2007; IRANPOUR *et al.*, 2019).

Figura 6:

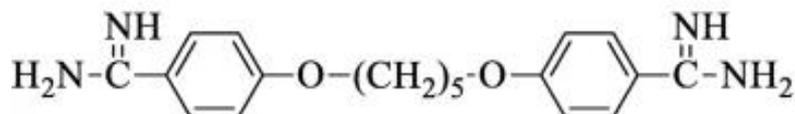


Estrutura Química do antimoniato de metilglucamina (adaptado de FOKOU *et al.*, 2021).

1.2.2 Pentamidina

A pentamidina ou isotionato de pentamidina (figura 7) é um derivado sintético proveniente da amidina, sendo eficaz contra diversos protozoários (GADELHA, *et al.*, 2015). Este fármaco é a segunda linha de escolha utilizada para o tratamento da leishmaniose. Ou seja, é utilizado geralmente quando não há uma boa resposta no tratamento dos pacientes com os antimoniais ou quando não podem fazer o uso do mesmo devido a sensibilidade do composto (NEVES, *et al.*, 2011). É um fármaco derivado sintético da amidina que possui grande eficácia contra diversos protozoários patogênicos, sendo uma delas a espécie *Leishmania spp.*, e possui duas vias de administração: a parenteral e a intramuscular (PICCICA, *et al.*, 2021; PAULA, *et al.*, 2003). Um fator limitante do isotionato de pentamidina é que ele apresenta uma alta toxicidade e muitos efeitos adversos, como: alterações cardíacas, hipoglicemia, toxicidade renal, podendo em alguns casos levar à morte dos pacientes (PICCICA *et al.*, 2021). Apesar de não ser bem elucidado o mecanismo de ação do isotionato de pentamidina, pressupõe-se que este fármaco inibe diferentes processos celulares, como a função do DNA, RNA e na biossíntese de proteínas, comprometendo o metabolismo energético dos parasitas, consequentemente causando a sua morte (NEVES *et al.*, 2011; PICCICA, *et al.*, 2021).

Figura 7:



Estrutura Química da pentamidina (adaptado de FOKOU *et al.*, 2021).

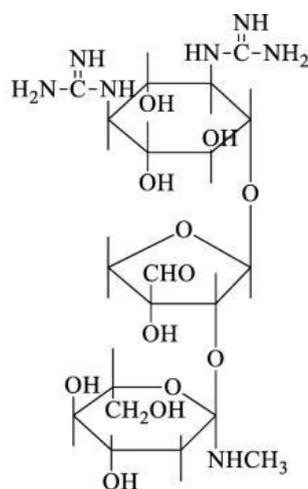
1.2.3 Anfotericina B

A anfotericina (Figura 8) é um fármaco antifúngico proveniente da espécie bacteriana *Streptomyces nodosus* e também é utilizado para o tratamento da leishmaniose. Seu mecanismo de ação ocorre através da formação de complexos

1.2.4 Paromomicina

A paromomicina (aminosidina) (figura 9) é um antibiótico de amplo espectro derivado de um aminoglicosídeo natural que é proveniente da bactéria *Streptomyces riomusus*. Entretanto, o mesmo apresenta atividade leishmanicida e é utilizado para tratamentos de LV e LT (BENAMI *et al.*, 2017). A sua forma farmacêutica apresentada é semi-sólida (pomada) e a sua via de administração é de uso tópico. Apesar de apresentar um percentual de cura considerável, os efeitos adversos deste medicamento são muito recorrentes, como: a nefrotoxicidade, ototoxicidade e a hepatotoxicidade, resultando na dificuldade para continuação da farmacoterapia com o mesmo (MINODIER e PAROLA, 2007; SANTIAGO *et al.*, 2021). O seu mecanismo de ação em bactérias é bem elucidado, visto que a paromomicina interfere diretamente na tradução de proteínas bacterianas. Já nos parasitas como a *Leishmania*, seu papel não foi claramente estabelecido, mas estudos *in vitro* mostraram que a paromomicina possui um efeito inibitório sobre os ribossomos do parasita, formando assim complexos prejudicados pela quebra de polissomas em monômeros não funcionais, resultando em síntese proteica alterada que acaba impedindo o crescimento do parasita (BENAMI *et al.*, 2017).

Figura 9:



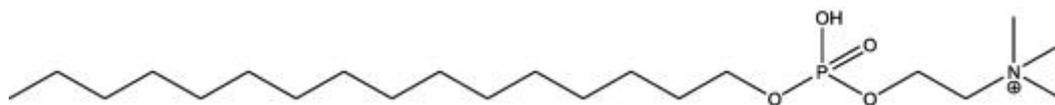
Estrutura Química da paromomicina (adaptado de FOKOU *et al.*, 2021)

1.2.5 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) (figura 10) é um fármaco antitumoral pertencente à classe das alquilfosfocolinas, possuem via de administração oral e o seu mecanismo de ação é bem elucidado. Quanto ao seu mecanismo de ação em células tumorais, sabe-se que a miltefosina atua interferindo nas vias de transdução do sinal celular e conseqüentemente acaba inibindo a biossíntese de fosfolipídeos e esteróis (MINODIER e PAROLA, 2007). Já nos parasitas, ainda não muito bem elucidado, acredita-se que a droga atua interferindo em sua membrana celular e não interagindo com o DNA, que por sua vez modula a composição lipídica, a fluidez da membrana e sua permeabilidade. Semelhante ao metabolismo dos fosfolipídios, induzindo assim a morte celular por apoptose (FILHO *et al.*, 2008).

No Brasil, desde 2021 o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece o tratamento específico e gratuito com cápsulas de miltefosina para pacientes com leishmaniose tegumentar que não obtiveram uma boa adesão aos tratamentos de primeira linha com os antimoniais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Entretanto, a miltefosina é um fármaco que apresenta alta toxicidade, possui bastantes efeitos adversos, podendo causar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade gastrointestinal grave; apresenta um alto custo financeiro, causa teratogenicidade e apresenta o tempo de meia-vida de 152 horas, podendo ocasionar a resistência de outros fármacos (CHEUKA *et al.* 2017; SANTIAGO *et al.*, 2021; WARE *et al.*, 2021).

Figura 10:



Estrutura Química da Miltefosina (adaptado de FOKOU *et al.*, 2021).

1.3 Produtos naturais no tratamento da Leishmaniose

Os produtos naturais são a subárea mais estudada da química orgânica. Desde a época do homem primitivo as plantas já eram exploradas, levando em conta que elas já eram utilizadas para o tratamento e cura de doenças. Os avanços tecnológicos no campo da biologia celular, molecular e bioquímica tornaram possível realizar análises de maior qualidade em sistemas biológicos. No Brasil, o uso de produtos naturais nas indústrias alimentícia e farmacêutica tem crescido drasticamente, justamente por ser um país rico em biodiversidade. Devido a isto, pesquisas científicas com produtos naturais microbianos também vêm crescendo ao longo dos anos (OLIVEIRA, 2013). Em um estudo, avaliaram a patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e seus efeitos no ciclo reprodutivo de *Thaumatotibia leucotreta*. Em busca de métodos de controle sustentáveis, a patogenicidade dos conídios secos de 17 isolados de *M. anisopliae* e cinco *B. bassiana* foram testados contra mariposas de *Thaumatotibia leucotreta*. Os resultados do estudo mostraram que os fungos testados foram virulentos para as mariposas, com 12 isolados causando mortalidade que variou entre 58,8 e 94,2% para *M. anisopliae* e três isolados entre 57,6 e 84,6% para *B. bassiana*. Os fungos entomopatogênicos isolados, *M. anisopliae* ICIPÉ 69 e *B. bassiana* ICIPÉ 279 foram altamente virulentas com tempos letais baixos para 50% de mortalidade (LT50) de 3,81 e 5,13, respectivamente. É de conhecimento que nas últimas duas décadas, houve um grande progresso nos estudos voltados para área de produtos naturais (MKIGA *et al.*, 2020; XIE, 2014).

Os microorganismos apresentam uma fonte promissora na busca de diversos metabólitos bioativos e têm originado alguns dos mais importantes produtos para a indústria farmacêutica com aplicações em diversas áreas: antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da motilidade gástrica, fármacos hipocolesterolêmicos, inseticidas, herbicidas, antiparasitáριοse entre outras (DEMAIN, 2009).

Existe uma estimativa na qual se observa que mais da metade dos produtos farmacêuticos em uso clínico são oriundos de produtos naturais (CHEUKA *et al.*, 2017). Os produtos naturais são boas fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, porém existem grandes desafios para o desenvolvimento dos mesmos, como a questão da sua eficiência e o fator socioeconômico (XIE, 2014).

Devido a essas evidências, faz-se necessário o estudo de novas linhas terapêuticas leishmanicida para a produção de novos medicamentos eficazes, de baixo custo, possuindo baixo ou sem efeitos adversos, viabilizando uma melhor adesão à terapia medicamentosa para o paciente.

1.4 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são microorganismos danosos que parasitam artrópodes. Os hospedeiros suscetíveis a estes fungos são penetrados diretamente em suas cutículas, tendo uma interação inicial e possivelmente decisiva entre os esporos do fungo e a epicutícula do inseto, conseqüentemente ocasionando a sua morte (MEYLING e EILENBERG, 2007; QU e WANG, 2018; URQUIZA e KEYHANI, 2013). Estes fungos acabam desenvolvendo mecanismos para adesão e reconhecimento de sinais da superfície do hospedeiro que ajudam a direcionar as respostas adaptativas, incluindo a produção de hidrolases, assimilados e/ou enzimas de desintoxicação, incluindo lipase/esterase, catalase, citocromo P450, proteases e quitinases; estruturas de infecção especializadas, como apêndices ou tubos penetrantes; metabólitos secundários e outros que promovem infecção (URQUIZA e KEYHANI, 2013). Possuem um papel crucial para a regulação de insetos na natureza, onde estes vêm sendo utilizados como alternativas ecológicas aos inseticidas químicos para o controle de pragas (MEYLING e EILENBERG, 2007; QU e WANG, 2018). São encontrados em duas divisões de filos Zygomycota e Ascomycota, e no antigo filo Deuteromycota. Possuem seus ciclos de vida de acordo com o estágio do inseto hospedeiro e das condições ambientais em que vivem (SHAH e PELL, 2003). Em especial, os fungos entomopatogênicos pertencentes aos

gêneros *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* têm sido muito utilizados para o tratamento no controle de diversos insetos- pragas agrícolas e de vetores de algumas doenças humanas (QU e WANG, 2018).

Figura 11: *Metarhizium anisopliae*



Fonte: <https://abrir.link/D7wW7>

Figura 12: *Beauveria bassiana*



Fonte: <https://bityli.com/MgnNDDjo>

1.4.1 Fungos entomopatogênicos e sua relação com vetores de doenças infecciosas

Existem diversos fungos entomopatogênicos que possuem atividades naturais contra insetos que agem como pragas naturais ou vetores de doenças, e destacam-se as espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Com isso, fungos como esses têm sido explorados e estudados a fim de se obter um conhecimento mais elucidado sobre a atuação dos mesmos em hospedeiros e vetores (ROCHA *et al.*, 2022). Em um estudo realizado no Brasil, foram coletadas 21 linhagens de fungos entomopatogênicos associados que afetam os mosquitos do *Aedes aegypti*. 7 eram de *Beauveria bassiana*, 7 de *Metarhizium humberi*, 3 de *M. anisopliae*, 2 de *Cordyceps sp.* e um de cada *Akanthomyces saksenae* e *Simplicillium lamellicola*. Com isso estudaram sobre a atividade biológica dos fungos sobre diferentes estágios dos mosquitos da Região Central do Brasil. Durante a avaliação da atividade das cepas dos fungos contra ovos, larvas e adultos de *A. aegypti* nas

condições laboratoriais, observou-se que as 3 cepas de *Metarhizium* demonstraram ser as mais promissoras para o desenvolvimento de estudos fornecendo novas estratégias para o controle do *A. aegypti* (ROCHA *et al.*, 2022).

Em outro estudo, analisaram os efeitos biológicos e bioquímicos dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces lilicanus* contra larvas de *Culex pipiens*, vetor responsável por diversas arboviroses, como o vírus da encefalite e do Nilo Ocidental (HAMAMA *et al.*, 2022). Os resultados apresentados demonstraram que, o *M. anisopliae* apresentou mortalidade larval máxima de 88% possuindo o menor tempo letal (TL₅₀) de 22,6 horas às 10 esporos/mL, em seguida *B. bassiana* 73,33% com TL₅₀ de 38,35 h e o *P. lilicanus* que apresentou um percentual mínimo de mortalidade de 65% com TL₅₀ maior de 51,5 h. Os valores médios de concentração letal (CL₅₀) apresentados foram de $1,027 \times 10^5$ esporos/mL para *M. anisopliae*, $1,24 \times 10^6$ esporos/mL para *B. bassiana* e $8,453 \times 10^6$ esporos/mL para *P. lilicanus*. Quanto à análise bioquímica, foi visto que as larvas tratadas com os fungos apresentaram decréscimos quantitativos em suas proteínas solúveis totais, lipídios e enzimas hidrolisantes de carboidratos, quando comparadas ao grupo controle (HAMAMA *et al.*, 2022).

Quanto a correlação desses fungos com vetores de zoonoses. Em um estudo analisaram a infecção do *M. anisopliae* em *Phlebotomus papatasi* em condições laboratoriais. Observou-se que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (Ma79) causou redução significativa na porcentagem de adultos quando aplicado nas larvas. Um aumento na concentração de Ma79 foi associado a uma diminuição na porcentagem de adultos, e a mortalidade total a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ variou de 30,9 a 83,9%. A porcentagem de mortalidade diminuía quando a temperatura era aumentada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ para $31 \pm 1^\circ\text{C}$ em todas as concentrações (ZAYED *et al.*, 2013).

JUSTIFICATIVA

As infecções por *Leishmania amazonensis*, causam um impacto significativo à saúde pública, afetando principalmente os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento que carecem de saneamento básico e estratégias de controle de vetores. Atualmente, há poucos medicamentos leishmanicidas disponíveis no mercado, limitando as opções de tratamento. Devido ao alto custo, baixa eficácia e diversos efeitos adversos, a adesão à terapia medicamentosa é comprometida, o que contribui para a progressão da condição clínica do paciente. Considerando que os produtos naturais são utilizados há décadas no tratamento de enfermidades e que apresentam diversas atividades biológicas, há um interesse em estudar suas propriedades para o tratamento da leishmaniose, visando o desenvolvimento de novos fármacos, com diferentes mecanismos de ação, eficácia superior aos fármacos leishmanicidas convencionais, de baixo custo e com menos efeitos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Avaliar a atividade leishmanicida de produtos bioativos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Leishmania amazonensis*.
- Obter extratos brutos da massa micelial e sobrenadante da cultura dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

2.2 Objetivo específico

- Determinar a atividade anti-promastigota de extratos dos fungos entomopatogênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo dos fungos

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é o isolado LPP 139, da coleção do laboratório de entomopatologia e fitopatologia da UENF. Foi coletado da broca de café (artrópode), no município de Bom Jardim/RJ. Já o *Metarhizium anisopliae* foi o isolado ESALQ818. Os dois fungos foram gentilmente cedidos pela aluna de doutorado Thais Berçot Teodoro e o professor Richard Ian Samuels, da UENF/CAMPOS-RJ. Para cada um dos dois isolados de fungo (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*), foram utilizados 3 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose (SD) (SIGMA) autoclavado a 120°C por 20 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, para manipulação em ambiente estéril, em cada frasco contendo o meio de cultura estéril foi inoculado 1 mL de suspensão na concentração de 1×10^7 conídios/mL. Os frascos foram mantidos em shaker orbital com 120 RPM, 27°C e fotoperíodo de 12/12h. Após 10 dias, os frascos foram retirados do shaker e levados à câmara de fluxo laminar para serem transferidos para tubos cônicos e centrifugados a 3000 RPM. O líquido sobrenadante foi congelado e a massa micelial foi secada em estufa de secagem a 27°C por 24 horas. Após a secagem, a massa micelial foi mantida em geladeira.

3.1.1 Métodos utilizados na extração dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para obtenção dos extratos brutos

A extração dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram realizados em dois métodos diferentes de extração. Na primeira etapa foi realizada a extração por filtração simples com algodão da massa micelial dos dois fungos com etanol 99,8% P.A (Exodo). Na segunda etapa foi realizada a partição líquido-líquido da parte sobrenadante dos fungos com o acetato de etila.

3.1.2 Filtração simples dos extratos brutos etanólicos

Inicialmente, as massas fúngicas foram pesadas na balança analítica e logo após cada uma foram colocadas separadamente em vidros Erlenmeyers de 100 mL. Em seguida foram adicionados 30 mL de Etanol 99,8% P.A (Exodo) em ambas as vidrarias. Após esse procedimento, os erlenmeyers foram tapados com papel alumínio e deixados por 7 dias (uma semana). Após o aguardo de 7 dias, a massa micelial dos fungos com o etanol foram filtradas por meio de filtro simples através de um algodão dentro de um funil, onde as partes filtradas dos dois fungos foram dispensadas em vidros separados para cada fungo, ou seja, 2 vidros. Os dois vidros com o meio filtrado foram colocados para secagem em ar comprimido na capela, evaporando o etanol e ficando somente o extrato das massas miceliais dos fungos.

Figura 13: Filtração simples

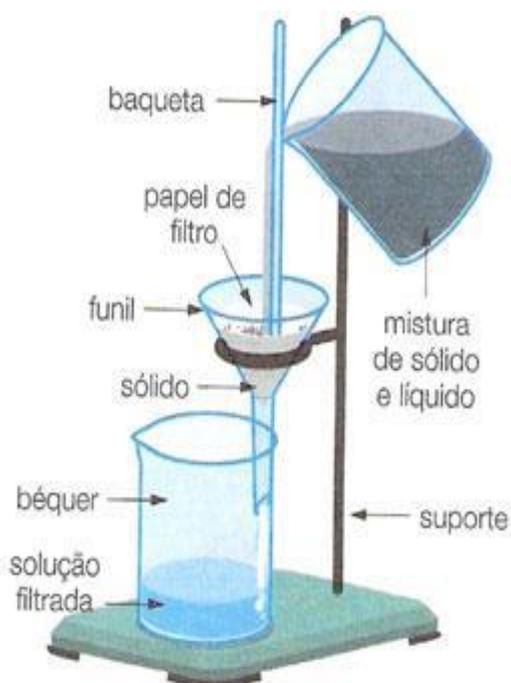


Figura 14: Ar comprimido



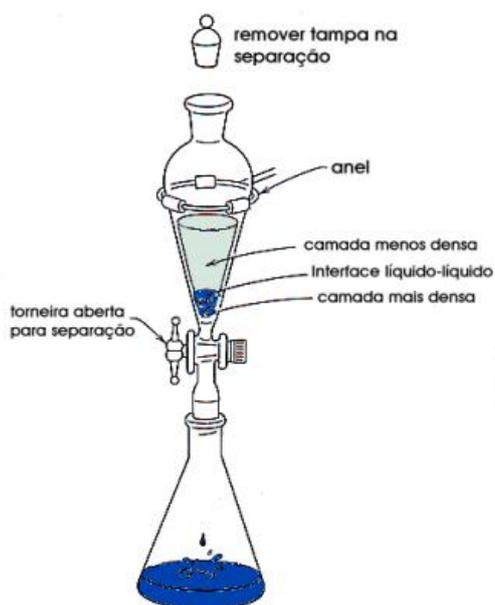
Fonte: (https://www.professorinterativo.com.br/aval_on_line/01_TICs/TIC_19/03_separacao_solidos_liquidos.html).

Fonte: Elaboração do autor.

3.1.3 Partição líquido-líquido dos extratos brutos

Inicialmente, com a ajuda de uma estante, garra, proveta, béquer e funil de partição, foi realizada a separação de 300 mL de sobrenadante de *B. bassiana* e 300 mL *M. anisopliae* em triplicata, onde toda vez era adicionado 100 mL de acetato de etila em ambas, agitava, deixava em repouso e separava a parte com o solvente. Os líquidos eram despejados em vidrarias erlenmeyers separadas, tendo a finalidade de separar a parte polar presente nos líquidos sobrenadantes dos dois fungos. Em seguida foram colocados para secagem em ar sob pressão na capela, evaporando o solvente e ficando somente a fração em acetato de etila dos sobrenadantes. O líquido remanescente foi congelado.

Figura 15: Partição líquido-líquido



Fonte: <https://qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.htm>

Figura 16: Ar comprimido



Fonte: Elaboração do autor.

3.2- Parasitos

Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa LV78 (MPRO/BR/72/M184), isoladas de lesões de camundongos. Foram mantidas por 48h

em cultura a 26°C na incubadora (NT 703 INCUBADORA B.O.D - nova técnica) em Meio Schneider (SIGMA) com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (HIFCS) (Cultilab), penicilina (SIGMA) (100 UI/mL) e estreptomicina (SIGMA) (100 µg/mL). Os parasitos foram utilizados na fase estacionária da cultura.

3.2.1 - Atividade anti-promastigota

Foram plaqueadas $2,0 \times 10^6$ /mL promastigotas de *L. amazonensis* em placas de 96 poços fundo chato na presença de frações dos extratos etanólicos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e das frações em acetato de etila *B. bassiana* e *M. anisopliae*, nas concentrações 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado a Anfotericina B a 10 µM (SIGMA) em meio Schneider, e o controle negativo foram poços não tratados. Foram incubadas por 48 horas a 26° C. A viabilidade das promastigotas foi analisada por ensaio colorimétrico de MTT (SIGMA) e leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices) a 570 nm. Resumidamente, ao final do experimento foi centrifugado a placa por 10 minutos a 1750g, retirando o sobrenadante e logo após 100 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço após a retirada do sobrenadante. A placa foi 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 foi realizada através espectrofotometria (570nm).

4. 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 realizadas utilizando GraphPad Prism 8.0.1.

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento dos extratos brutos obtidos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* por filtração simples em meio etanólico 99,8% P.A.

Para determinar o peso final da massa micelial de ambos fungos, foram pesados os micélios em tubos cônicos e descontado o peso dos tubos vazios. O resultado pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1: Pesagem da massa micelial dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M. anisopliae*.

Fungos entomopatogênicos	Massa micelial dos fungos no tubo cônico	Massa do tubo cônico vazio	Massa total obtida dos fungos
<i>B. bassiana</i>	14,8980 g	13,3330 g	≅ 1,57g
<i>M. anisopliae</i>	16,3751 g	13,4155 g	≅ 2,96g

Legenda: Pesagem da massa micelial dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Subtração entre a massa do tubo cônico vazio e a massa micelial dos fungos no tubo cônico para obtenção da massa total dos fungos.

A massa micelial total obtida dos fungos foi macerada em etanol e incubada por 7 dias. O material solúvel foi separado por filtração simples em papel de filtro e colocado em dois frascos de vidro esterilizados. O extrato etanólico bruto foi submetido à secagem em ar sob pressão para eliminação do etanol, obtendo, dessa forma, o extrato bruto dos fungos (Fig. 11 e 12). O material seco foi pesado e guardado em temperatura ambiente.

Tabela 2: Rendimento do extrato bruto etanólico dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M.anisopliae* por filtração simples.

Fungos entomopatogênicos	Vidro vazio	Vidro com extrato bruto	Rendimento do extrato bruto dos fungos
<i>B. bassiana</i>	22,2177g	22,3254	107,7 mg
<i>M. anisopliae</i>	22,5098g	22,7570	247,2 mg

Legenda: Quantificação do rendimento do extrato bruto etanólico dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* por filtração simples. Subtração entre o vidro com extrato bruto e o vidro vazio para obtenção da massa total do extrato bruto dos fungos em etanol.

Mediante a esses resultados, o rendimento da extração etanólica obtida dos fungos *B.bassiana* e *M. anisopliae* foram respectivamente 6,8% e 8,3%.

Tabela 3: Cálculo do rendimento dos extratos brutos etanólicos dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M. anisopliae*.

Fungos entomopatogênicos	Cálculo do rendimento dos Extratos Etanólicos
	peso micelial _____ 100%
Fórmula do Cálculo	peso da fração seca ----- X
<i>B. bassiana</i>	1,57 g ----- 100% X= 6,8% de rendimento. 0,1077g -----X
<i>M. anisopliae</i>	2,96g ----- 100% X= 8,3% de rendimento. 0,2472 g ----- X

Legenda: Cálculo do rendimento dos extratos brutos etanólicos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Foi realizado um cálculo da regra de três, onde a massa total obtida dos fungos correspondia a 100% e a massa total do extrato bruto etanólico dos fungos correspondia a porcentagem de rendimento do extrato. Este cálculo foi realizado para a obtenção da porcentagem de rendimento dos extratos brutos.

5.2 Rendimento da fração dos sobrenadantes obtidos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* por partição líquido-líquido.

Foi realizada o fracionamento do sobrenadante da cultura dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* através de partição líquido-líquido em acetato de etila. O material fracionado foi colocado em dois frascos de vidros separadamente, em

seguida em secagem sob pressão na capela, evaporando os solventes, ficando somente a parte fracionada (Fig 13 e 14). Por fim, foi quantificado o peso das frações obtidas e o cálculo de rendimento da extração (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Pesagem das frações obtidas com acetato de etila dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M. anisopliae*.

Fungos entomopatogênicos	Massa do frasco vazio	Massa do frasco com a fração obtida	Massa total das frações dos fungos
<i>B. bassiana</i>	29,8592 g	29,8730g	13,8 mg
<i>M. anisopliae</i>	31,1873 g	31,2091g	21,8 mg

Legenda: Quantificação das frações obtidas em acetato de etila dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* por partição Líquido-Líquido. Subtração da massa do frasco com a fração obtida e a massa do frasco vazio para obtenção da massa total das frações dos fungos em acetato de etila.

Mediante a esses resultados, o rendimento do fracionamento dos fungos em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram respectivamente: 0,004% e 0,007%. O líquido remanescente foi congelado.

Tabela 5: Cálculo de rendimento das frações obtidas com acetato de etila dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M. anisopliae*.

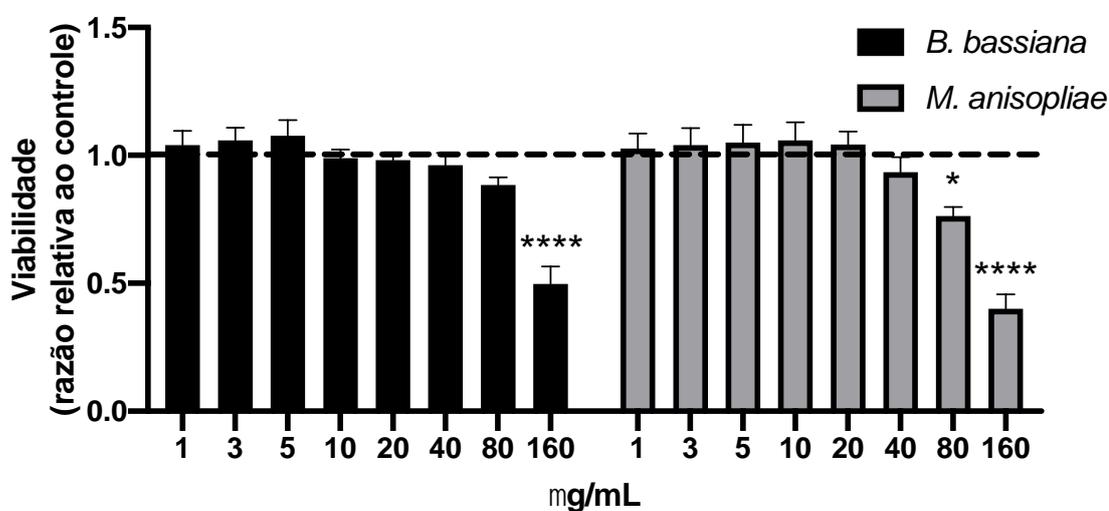
Fungos entomopatogênicos	Cálculo de Rendimento das frações obtidas em Acetato de etila
Fórmula do Cálculo	<p>peso de sobrenadante ----- 100%</p> <p>peso da fração seca ----- X</p>
<i>B. bassiana</i>	<p>300g ----- 100% X= 0,004% de rendimento.</p> <p>0,0138g ----- X</p>
<i>M. anisopliae</i>	<p>300g ----- 100% X= 0,007% de rendimento.</p> <p>0,0218 g ----- X</p>

Legenda: Cálculo do rendimento das frações em acetato de etila dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Foi realizado um cálculo da regra de três, onde o sobrenadante correspondia a 100% e a fração seca em acetato de etila dos fungos correspondia à porcentagem de rendimento do extrato. Este cálculo foi realizado para a obtenção da porcentagem de rendimentos das frações dos fungos em acetato de etila.

5.3 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* da fração obtidas em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Para verificar a atividade leishmanicida das frações em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi realizado o teste de atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* conforme descrito no item 4.2. L. Como controle positivo foi utilizado a Anfotericina B a 10 μ M, e o controle negativo foram poços não tratados com apenas o meio e as promastigotas. A atividade leishmanicida foi expressa através da porcentagem de inibição de crescimento dos parasitos. As frações apresentaram atividades, a *B. bassiana* não teve seu IC₅₀ bem estabelecido pois o resultado deu como ambíguo, porém o *M. anisopliae* foi o extrato que apresentou a melhor atividade leishmanicida com IC₅₀ 140,2 μ g/mL (Fig 15).

Figura 17: Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* da fração obtida em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

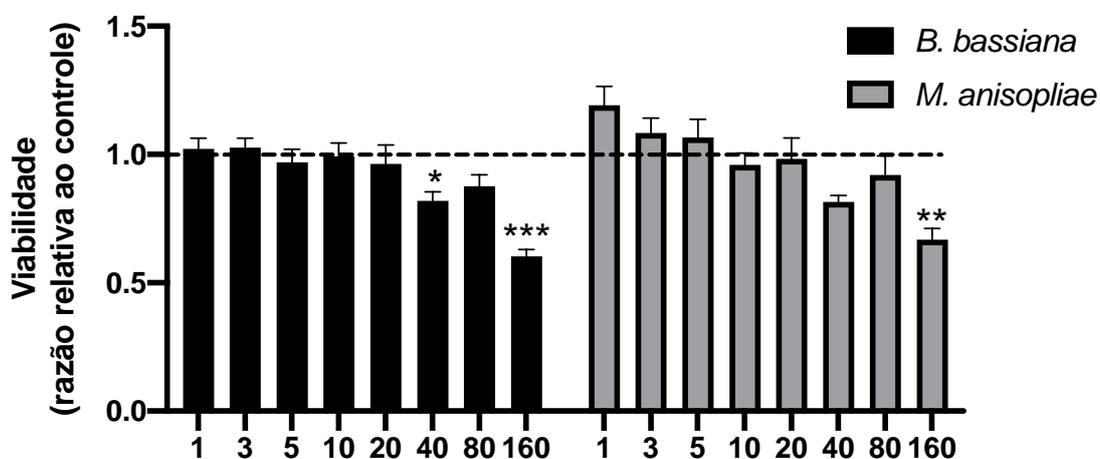


Legenda: Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* da fração obtida em acetato de etila do sobrenadante da cultura dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Promastigotas ($2,0 \times 10^6$ /mL) de *L. amazonensis* foram incubadas com as concentrações indicadas dos extratos e Anfotericina B (10 mM) durante 48 horas a 26° C. Após incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada através de ensaio colorimétrico de MTT. Média \pm SEM referente a 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

5.4 Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* do extrato bruto etanólico dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Para verificar a atividade leishmanicida do extrato bruto etanólico foi realizado o teste de atividade anti-promastigotas de *L. amazonensis* conforme descrito no item 4.2. As concentrações dos extratos utilizados no ensaio foram 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL. O controle positivo utilizado foi a Anfotericina B a 10 µM, e o controle negativo foram poços não tratados com apenas o meio e as promastigotas. A atividade leishmanicida foi expressa através da porcentagem de inibição de crescimento dos parasitos. Os extratos apresentaram atividades, porém seu IC₅₀ não foi bem estabelecido, pois os resultados deram ambíguos (Fig 16).

Figura 18: Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* do extrato bruto etanólico dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.



Legenda: Atividade anti-promastigota de *L. amazonensis* do extrato bruto etanólico dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Promastigotas ($2,0 \times 10^6$ /mL) de *L. amazonensis* foram incubadas com as concentrações indicadas dos extratos, Anfotericina B (10 mM) durante 48 horas a 26° C. Após incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada através de ensaio colorimétrico de MTT. Média \pm SEM referente a 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças endêmicas principalmente nos países com clima tropical, como por exemplo, os países da América do Sul. Dentre esses países o Brasil continua sendo o país que apresenta a maior taxa de letalidade (OPAS, 2021). Atualmente, os principais fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose são anfotericina B, antimoniato de metilglucamina, pentamidina, paromomicina e miltefosina (FOKOU *et al.*, 2021). Costumam a serem administrados por um grande período de tempo e, como consequência, os parasitas acabam adotando vários mecanismos de resistência contra esses fármacos. Observa-se baixa adesão à terapia medicamentosa devido ao longo tempo de tratamento, por apresentarem toxicidade e efeitos adversos que são extremamente danosos para os pacientes em tratamento (KAMMONA e TSANAKTSIDOU, 2021). Os produtos naturais apresentam alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos através de seus compostos isolados. Servem muitas das vezes como base para a preparação e desenvolvimento de derivados sintéticos, dando origem a extratos que possuem metabólitos secundários, provenientes da interação com o meio ambiente ou outras espécies. Em diversas literaturas já foram descritos que os metabólitos extraídos de produtos naturais apresentam atividade em *Leishmania spp.*, em suas formas evolutivas promastigota e amastigota (BEKHIT *et al.*, 2018; WAGENAAR, 2008).

Em um estudo, o efeito leishmanicida de quatro extratos brutos de fungos endofíticos foram analisados contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Todos os extratos no estudo começaram a apresentar atividade leishmanicida impedindo a proliferação celular na concentração de 5 mg/mL em 24 h. Os extratos foram comparados ao Glucantime padrão utilizado (250 µg/mL) em 24h. Após 96 e 168 horas, todos os extratos em todas as concentrações reduziram a proliferação celular (ALVES *et al.*, 2018)

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies fúngicas na terra, porém a maioria desses fungos ainda não foram identificados. A descrição desses

fungos é de suma importância, pois além da ampliação da aglomeração micológica e da descoberta da biodiversidade microbiana, espera-se que esses organismos possam ser promissores para estudar as questões da medicina, agricultura, entre outros (TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Neste estudo realizado foram utilizados os extratos brutos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. O produto obtido na fração em acetato de etila do sobrenadante da cultura de *M. anisopliae* apresentou melhor atividade leishmanicida, com concentração inibitória (IC₅₀) de 140,2 µg/mL. Os outros três extratos testados apresentaram atividade leishmanicida, porém, apenas nas concentrações mais altas, de 160 e 80 µg/mL. Nesses casos não foi possível definir o IC₅₀ nos testes realizados, pois a análise estatística se apresentou ambígua.

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 e CRAGG, 2016). Primeiramente foi realizada a extração da massa micelial dos fungos por filtração simples com etanol para a obtenção do extrato etanólico bruto. Na sequência, foi feita a partição líquido-líquido do sobrenadante da cultura dos fungos, com o solvente acetato de etila para a obtenção das frações dos fungos. Ao final dessas etapas foram obtidos as massas e o rendimento do extrato etanólico bruto (micelial) e a fração em acetato de etila (sobrenadante). O rendimento da extração etanólica da massa micelial obtida das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi respectivamente 6,8% (107,7 mg peso final) e 8,3% (247,2 mg de peso final). Nas frações em acetato de etila secretados no sobrenadante das culturas o rendimento foi mais baixo, respectivamente 0,004% (13,8 mg de peso final) e 0,007% (21,8 mg de peso final). Dos extratos brutos dos fungos entomopatogênicos testados, todos eles apresentaram atividade leishmanicida na espécie *Leishmania amazonensis*. Dos extratos e frações testadas, quando comparados em qual se obteve uma melhor atividade, um se sobressaiu, sendo ela a fração em acetato de etila obtida dos

produtos secretados na cultura de *M. anisopliae*, com concentração inibitória média (IC₅₀) de 140,2 µg/mL. O fato de que existem substâncias secretadas por *M. anisopliae* com atividade leishmanicida sugere que a infecção de flebotomíneos pode ser uma estratégia para o controle microbiológico da infecção do inseto vetor, principalmente em regiões endêmicas. Além disso, na literatura encontramos outros extratos de outros fungos que apresentaram atividade leishmanicida, como o extrato etanólico de *Croton blanchetianus*, que apresentou atividade anti promastigotas de *L. amazonensis*, reduzindo a viabilidade do parasito, tendo sua IC₅₀ 73,6 µg/mL (PEREIRA *et al.*, 2020). Em outro estudo, extratos brutos (CH, CD/Ete CEA) obtidos das folhas de *Citrus sinensis* apresentaram atividade anti promastigota em *L. amazonensis*, onde o CH, CD/Et e CEA apresentaram IC₅₀ de 25,91 ± 4,87, 54,23 ± 3,78 e 62,74 ± 5,04 µg/mL, respectivamente (GARCIA *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos aqui são promissores, principalmente considerando que não há estudos de fungos entomopatogênicos relacionados com atividade leishmanicida. Entretanto, há estudos que demonstram a atividade destes fungos em outros protozoários. A infecção por *Metarhizium anisopliae* causa a redução da reprodução de *Trypanosoma congolense* no vetor *Glossina fuscipes fuscipes* diminuindo sua capacidade de adquirir ou transmitir o parasita. No estudo, as moscas foram alimentadas com sangue infectado por *T. congolense* por 2 horas e depois infectadas com tecido de tapete de veludo impregnado com conídios cobertos dentro de um tubo cilíndrico de plástico por 12h. As moscas controle foram alimentadas com sangue infectado por *T. congolense*, mas não expostas ao tratamento fúngico através do tecido do tapete dentro de um tubo cilíndrico de plástico. Os insetos foram dissecados 2, 3, 5 e 7 dias pós-exposição fúngica e a densidade de parasitas quantificada. A carga parasitária diminuiu de $8,7 \times 10^7$ no dia 2 para entre $8,3 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^5$ *T. congolense* mL⁻¹, no 3º dia após exposição ao fungo em grupos de moscas tratadas com fungos (WT e GZP-1). Quando as moscas de *T. congolense* infectadas foram expostas a qualquer uma das cepas fúngicas, elas não transmitiram o parasita aos camundongos, enquanto as moscas do

tratamento controle permaneciam capazes de transmitir o parasita. Além disso, moscas inoculadas com *M. anisopliae* que se alimentaram de camundongos infectados com *T. congolense* não foram capazes de adquirir os parasitas 4 dias após a exposição ao fungo, enquanto a aquisição do parasita foi observada no tratamento controle durante o mesmo período (WAMITI *et al.*, 2018).

Em outros casos, há estudos sobre a atividade inseticida e antimicrobiana dos fungos entomopatogênicos. Em um estudo, vimos que foi avaliado a atividade enzimática extracelular de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e seu potencial de patogenicidade como agente de biocontrole contra moscas brancas, *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) na Etiópia. Os dados mostraram que os isolados de *Beauveria bassiana* AAUMB-29, AAUMFB-77 e AAUEB-59 geraram as maiores atividades de quitinase (EI = 3,41), lipase (EI = 4,45) e protease (EI = 5,44), respectivamente. O estudo de patogenicidade de isolados em ninfas e adultos de mosca-branca indicou variação significativa com mortalidade variando de 71,67 a 98,33% e 60 a 100% contra ninfas de *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* respectivamente. A mortalidade de adultos ficou entre 58 e 94,27% contra *B. tabaci* e 59,03 a 95,37% contra *T. vaporariorum*. Os compostos isolados AAUMB-29, AAUMFB-77 e AAUDM-43 foram os mais virulentos, com valores de LC₅₀ de $2,7 \times 10^4$, $5,3 \times 10^4$ e $5,4 \times 10^4$ conídios/mL contra ninfas de *B. tabaci*, e com valores de LC₅₀ $6,8 \times 10^4$, $8,2 \times 10^4$, e $7,2 \times 10^4$ conídios/ml contra ninfas de *T. vaporariorum*, respectivamente. A *B. bassiana* AAUMB-29, *B. bassiana* AAUMFB-77 e *M. anisopliae* AAUDM-43 induziram a maior mortalidade de mosca branca do que outros isolados (GEBREMARIAM *et al.*, 2022). Em outro estudo, vimos que foi avaliado a atividade antibacteriana dos extratos de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* isolados de nematóides entomopatogênicos contra bactérias resistentes a antibióticos. Quatro isolados de extratos de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* mostraram eficácia contra muitas bactérias resistentes a antibióticos, porém o *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* (bSBR 36.2 _TH) apresentou o maior efeito inibitório

em *S. aureus* estirpe PB36 (MRSA), comparado com os isolados bacterianos testados. Descoberta de suma importância para o desenvolvimento de um novo medicamento antimicrobiano através de recursos naturais (MUANGPAT *et al.*, 2020).

Os extratos avaliados neste trabalho apresentaram atividade anti-promastigota, em especial a fração obtida do material secretado no sobrenadante da cultura de *M. anisopliae*. É importante dar prosseguimento aos experimentos relativos ao subfracionamento, atividade anti-amastigota, testes de seletividade e avaliação do mecanismo de ação, principalmente devido aos trabalhos na área que indicam serem promissores as espécies fúngicas *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle da transmissão de diversos agentes etiológicos de zoonoses de importância médica no Brasil.

7. CONCLUSÃO

Foi observada a atividade tóxica em promastigotas de *L. amazonensis* tanto nos extratos da massa micelial quanto na fração obtida do sobrenadante em ambas as espécies fúngicas testadas. No entanto, a fração do material secretado na cultura da espécie *M. anisopliae* apresentou maior atividade leishmanicida. A extração dos fungos entomopatogênicos *B. Bassiana* e *M. Anisopliae* estudados foram realizados com sucesso. Os testes realizados indicam que estas espécies fúngicas podem ser fonte de produtos bioativos com atividade leishmanicida, sendo necessários mais estudos de subfracionamento, toxicidade em células de mamíferos e atividade anti-amastigota. Além da determinação do mecanismo de ação de possíveis substâncias isoladas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, D. R. *et al.* Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **PLOS ONE**, 2018.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v.10, n.3, p. e0004349, 2016.
- BEKHIT, A. A. *et al.* Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European journal of medicinal chemistry**, v.160, p.229-244, 2018.
- BENAMI, M. S. *et al.* Atomic resolution snapshot of Leishmania ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. **Nature communications**, v. 8, n.1589, 2017.
- BERMAN, J. D; WADDELL, D; AND HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.27, n.6, p.916–920, 1985.
- BRASIL, **Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana.** Secretaria da vigilância em saúde, 2.^a edição atualizada, Brasília – DF 2007
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.** Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 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.
- CDC- **Centers for Disease Control and Prevention**, Disponível em:
<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acessado em: 07 de julho de 2022.
- CHEUKA, P. M. *et al.* The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v.22, n.1, p.58, 2017.

- COURRET, N. *et al.* Kinetics of 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.
- Demain, A. L.; Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v.62, p.5-16, 2009.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v.14, n.5, p.417-423, 1996.
- DNDI Leishmanioses – **DNDi América Latina** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>> Acessado em: 22 de julho de 2022.
- Extração Líquido-Líquido - Disponível em: <<https://qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.html>> Acessado em: 27 de setembro de 2022.
- FILHO, A. V. C. *et al.* Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.424-427, 2008.
- FOKOU, J. B.H. *et al.* Anti-leishmanial and anti-trypanosomal natural products from endophytes. **Parasitol Research**, v.120, p.785–796, 2021.
- GADELHA, E. P. *et al.* Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. **Anais Brasileiros de dermatologia**, v.90, p.807-813, 2015.
- GARCIA, A. R. *et al.* Cytotoxicity and anti-*Leishmania amazonensis* activity of *Citrus sinensis* leaf extracts. **Pharm Biol**, v.55, n.1, p.1780-1786, 2017.
- 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.
- GEBREMARIAM, A. *et al.* Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **BMC Res Notes**, v.15, n.1, 2022.
- GHORBANI, M; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Design de drogas, desenvolvimento e terapia**, v.12, p.25, 2018.

- GLUENZ, E. *et al.* Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. **Current opinion in microbiology**, v.13, n.4, p.473-479, 2010.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v.26, n.2, p.293-307, 2012.
- HAMAMA, H. M. *et al.* Virulence of entomopathogenic fungi against *Culex pipiens*: Impact on biomolecules availability and life table parameters. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.29, n.1, p.385-393, January 2022.
- IRANPOUR, S; HOSSEINZADEH, A; ALIPOUR, A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiol Health** , v.41, 2019.
- KAMMONA, O; TSANAKTSIDOU, E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, v.605, n.10, 2021.
- KUMARI, S. *et al.* Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.235, 2022.
- 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.
- LOPES, D. G. *et al.* Axenic amastigotes of Leishmania species as a suitable model for in vitro studies. **Acta Tropica** , v.220, p.105956, 2021.
- MAILLO, B. M; VÉLEZ, R. L. Anfotericina B liposomal en el tratamiento de la leishmaniasis visceralLiposomal amphotericin B to treat visceral leishmaniasis. **Iberoamerican Journal of Micrology**, v.38, p.101-104, 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **LEISHMANIOSES: MINISTÉRIO DA SAÚDE ALERTA PARA PREVENÇÃO.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/leishmanioses-ministerio-da-saude-alerta-para-prevencao> Acessado em: 17 de agosto de 2022.
- MINODIER, P; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **ELSEVIER**, v.5, p. 150-158, 2007.
- MEYLING, N. V; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, n.2, p.145-155, 2007.
- MKIGA, A. M. *et al.* Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana: Pathogenicity, Horizontal Transmission, and Their Effects on Reproductive Potential of Thaumatotibia leucotreta (Lepidoptera: Tortricidae). **J Econ Entomol**, v.113, n.2, p. 660-668, 2020.
- MOORE J. P. A; GANGNEUX P. J.; PAPPAS G. P. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **International Society for human and Animal Mycology**, v.54, p.223-231, 2016.
- MUANGPAT, P. *et al.* Antibacterial activity of Xenorhabdus and Photorhabdus isolated from entomopathogenic nematodes against antibiotic-resistant bacteria. **PloS One**, v.15, n.6, 2020.

- NEVES, L. O. *et al.* A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, p.1092-1101, 2011.
- 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
- NORMAS TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. **Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde**. Disponível em : <<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/MatrizesConsolidacao/comum/37559.html>> Acessado em: 29 de setembro de 2022.
- 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.
- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>> Acessado em: 18 de julho de 2022.
- PAULA, C. D. R. *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, 2003.
- PEREA, J. R. A; Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinamiaLiposomal amphotericin B: Clinical pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Iberoamerican Journal of Micrology**, v.38, p.52-55, 2021.
- PEREIRA, K. L. G. *et al.* Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* Ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.92, n.2, 2020.
- PICCICA, M. *et al.* Efficacy and safety of Pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, 2021.
- QU, S; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental & Comparative Immunology**, v.89, p.96-103, 2018.
- RATH, S. *et al.* Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: **the state of the art**, vol.26, n.4, p.550-555, 2003.
- RAYCHAUDHURY, B. *et al.* Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta tropical**, v.95, n.1, p.1-8, 2005.
- ROCHA, L. F. N. *et al.* Occurrence of entomopathogenic hypocrealean fungi in mosquitoes and their larval habitats in Central Brazil, and activity against *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.194, 2022.

- RODRIGUES I. A. *et al.* Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators Inflamm**, 2015.
- ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v.124, n.5, p.495-507, 2002.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v.223, n.4643, p.1417-1419, 1984.
- 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.
- SANTIAGO, A. S. *et al.* Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v.10, n.7, 2021.
- Separação de sólidos e Líquidos. Disponível em:
<https://www.professorinterativo.com.br/aval_on_line/01_TICs/TIC_19/03_separacao_solidos_liquidos.html> Acesso em: 27 de setembro de 2022.
- SHAH, PA; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.413-423, 2003.
- SOARES, R. J. B; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracellular molecules as a drug target. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.139–149, jun. 2004.
- STIERHOF, York-Dieter. *et al.* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European journal of cell biology**, v.78. p. 675-689,1999.
- 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.
- URQUIZA, A. O; KEYHANI, N. O. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. **Insects**, v.4, n.3, p.357-374, 2013.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v.26, n.2, p.309-322, 2012.
- WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples—the second generation natural products library at Wyeth. **Molecules**, v.13, n.6, p.1406-1426, 2008.

- WAMITI, L. G. *et al.* *Metarhizium anisopliae* infection reduces *Trypanosoma congolense* reproduction in *Glossina fuscipes fuscipes* and its ability to acquire or transmit the parasite. **BMC Microbiology**, v.18, n.142, 2018.
- WARE, J. M. *et al.* Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.73, p.2457-2562, 2021.
- 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**, v598, p. 124-804, 2020.
- WHO-World Health Organization. Leishmaniasis. **World Health Org.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1> Acessado em: 18 julho 2022.
- WHO-World Health Organization. Leishmaniasis. **World Health Org.** Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis_vl_2020.pdf?sfvrsn=17eea7b2_7 Acessado em: 22 de julho de 2022.
- WHO-World Health Organization. Leishmaniasis. **World Health Org.** Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/2021-dha-docs/leishmaniasis_cl_2020.pdf?sfvrsn=716850a8_9 Acessado em: 22 de julho de 2022
- ZAYED, A. *et al.* Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v.50, n.4, p.796-83, 2013.
- ZILBERSTEIN, D; MYLER P. J. Arginine sensing in intracellular parasitism of Leishmania. **Curr Opin Microbiol**, v.64, p.41-46, 2021.