



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Hilda Caroline do Nascimento Santos

Produção e avaliação da atividade leishmanicida de extratos de fungos isolados da Antártica e prospecção tecnológica de metabólitos fúngicos.

Maceió/AL

2023

HILDA CAROLINE DO NASCIMENTO SANTOS

Produção e avaliação da atividade leishmanicida de extratos de fungos isolados da Antártica e prospecção tecnológica de metabólitos fúngicos.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Maceió/AL

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Jorge Raimundo da Silva – CRB-4 - 1528

S237p Santos, Hilda Caroline do Nascimento.

Produção e avaliação da atividade leishmanicida de extratos de fungos isolados da Antártica e prospecção tecnológica de metabólitos fúngicos. / Hilda Caroline do Nascimento Santos. 2023.
65 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientador: Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 62-65.

1. Atividade leishmanicida. 2. Fungos antárticos. 3. Leishmaniose.
4. Prospecção tecnológica. I. Título.

CDU: 616.928.5

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela saúde que me concede para que eu possa ir em busca dos meus sonhos, e a Nossa Senhora por ser a luz que ilumina meus caminhos.

Aos meus pais, Júnior e Lila, por todo o amor, dedicação, educação e apoio. Sou grata por todos os esforços, incentivo, conversas e orações que fizeram com que eu chegasse até aqui. A vocês, dedico todas as minhas conquistas, pois são a minha fortaleza e a razão de tudo.

À minha tia e madrinha Allane, pelo apoio, incentivo, orações e por ser “a minha pessoa”.

Ao meu avô Zeca (*in memoriam*) pelos 27 anos de convivência e amor dedicados a mim. Pelos ensinamentos, ajuda, pelos momentos juntos, pelo orgulho que sempre deixou claro que sentia por mim e pela confiança na pessoa e profissional que me tornei. Você nunca será esquecido.

Ao meu amor, Thallys, por sua paciência, amor, carinho, apoio e por sempre estar ao meu lado, acreditando e me incentivando na busca dos meus sonhos e objetivos.

Aos amigos que fiz ao longo da vida. Aos que na faculdade, que tanto me ajudaram e ajudam: Taise, Alina, Larissa, Láyla, Lilyana, Alinho, Lucas, Júlia e Alisson.

Aos amigos que fiz no laboratório, Shakira e Izabelly que estão comigo desde os tempos de iniciação científica, e Camilla a quem eu tive o privilégio de conhecer no mestrado. Obrigada pela amizade, por toda ajuda e apoio. Sem vocês, teria sido bem mais difícil.

Às minhas sempre e eternas “Coori’s”, Amanda, Morgana e Mariana. Grata por toda a ajuda, conselhos e incentivo. A vocês, toda a minha admiração.

À minha orientadora, Magna Suzana, pela oportunidade, pela ajuda, pelos conselhos, pela compreensão e por ter sido tão essencial para que eu pudesse finalizar este trabalho. A Sra é um exemplo de força e determinação que inspira quem vive ao seu redor.

À família LaFI, por todo o apoio, ajuda e momentos incríveis vividos ao longo desses anos: Marcio, Kaycke, Shakira, Camilla, Letícia, Suellen, Amanda, Lilyana, Éder, Fábio, Joyce, Rachel, Anderson, Vitória, Mayná e outros de outras gerações que já ajudaram de forma direta ou indireta na minha formação.

À professora Aline Cavalcanti, por todos os ensinamentos. Ao professor Alysson Duarte, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse usá-lo para fazer partes dos meus experimentos. Aos que fazem o LabMip, em especial a Kalyne, Nicolle e Kelly, obrigada por toda ajuda.

Ao professor Luiz Henrique Rosa e a todos que fazem o seu laboratório.

"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo do céu." Ec 3-1.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, infecciosa e não contagiosa que é causada por parasitos do gênero *Leishmania*. A *Leishmania* possui duas formas evolutivas, a promastigota e a amastigota, e duas manifestações clínicas principais: tegumentar e visceral, sendo esta última a de maior preocupação, pois, caso não seja tratada pode levar o paciente a óbito. Apesar da grande complexidade da doença, o arsenal terapêutico ainda é bastante limitado, sendo os antimoniais pentavalentes a primeira escolha e fármacos como anfotericina b e pentamidina como segunda escolha. Porém, essa terapia apresenta efeitos adversos indesejáveis, além de uma significativa citotoxicidade e resistência parasitária. Diante desta problemática, o presente estudo avaliou extratos de fungos produtores de metabólitos secundários oriundos da Antártica, bem como realizou uma revisão patentária acerca da atividade leishmanicida de metabólitos fúngicos. No estudo experimental, foi produzida a biomassa desses fungos, extração com solventes de acetato de etila e acetona, concentração do pigmento, secagem, diluição, testes de viabilidade celular (MTT) e de avaliação da atividade leishmanicida frente a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Foram produzidos extratos de leveduras (19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19) e de fungos filamentosos (4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetato, 2FFLQ6 acetona, 1EMP1, 3EMP4 e 2EMP4), testados nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio de viabilidade celular, o efeito citotóxico máximo encontrado dos extratos de leveduras foi de $40,54 \pm 3,37\%$; $24,37 \pm 3,66\%$; $29,09 \pm 3,57\%$; Nenhuma Atividade (NA); $22,98 \pm 1,63\%$, respectivamente. O efeito citotóxico de fungos filamentosos foi de: $60,53 \pm 2,50\%$; $67,33 \pm 1,51\%$; $19,68 \pm 6,62\%$; $19,68 \pm 6,62\%$; $23,38 \pm 7,16\%$; $17,30 \pm 10,59\%$; Na e NA. Já no ensaio para avaliar a atividade leishmanicida, os extratos de leveduras testados (nas duas espécies) e de fungos filamentosos (para *L. chagasi*) não conseguiram ser letais para os parasitos até a máxima concentração testada, que foi 100 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona apresentaram efeito máximo de $74,36 \pm 4,10\%$ e $84,62 \pm 5,32\%$ contra a espécie de *L. amazonensis*, sendo assim necessária a realização de mais estudos na área. Na revisão patentária, foram selecionadas patentes de 2012-2022 que estivessem dentro da temática, onde estas demonstraram atividade contra as espécies de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, além de uma baixa toxicidade. Apesar dos resultados, o assunto ainda é pouco abordado pela comunidade científica e se faz necessária a continuação e o incentivo à pesquisa de bioprospecção utilizando isolados e extratos fúngicos.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, Fungos antárticos, Leishmaniose, Prospecção tecnológica.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected, infectious, and non-contagious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. *Leishmania* has two evolutionary forms, promastigote and amastigote, and two main clinical manifestations: cutaneous and visceral, with the latter being of greater concern as it can lead to the patient's death if untreated. Despite the complexity of the disease, the therapeutic arsenal remains limited, with pentavalent antimonials being the first choice and drugs like amphotericin B and pentamidine as the second choice. However, this therapy presents undesirable adverse effects, along with significant cytotoxicity and parasitic resistance. In light of this issue, the present study evaluated extracts from fungus producing secondary metabolites from Antarctica, and also conducted a patent review regarding the leishmanicidal activity of fungal metabolites. In the experimental study, the biomass of these fungi was produced, followed by solvent extraction using ethyl acetate and acetone, pigment concentration, drying, dilution, cell viability tests (MTT), and evaluation of leishmanicidal activity against the promastigote form of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. Yeast extracts (19L15, 4L2, 2L19, NL1, and GL19) and filamentous fungus extracts (4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetate, 2FFLQ6 acetone, 1EMP1, 3EMP4, and 2EMP4) were produced and tested at concentrations of 100, 30, 10, 3, 1, and 0.3 $\mu\text{g/mL}$. In the cell viability assay, the maximum cytotoxic effect found for yeast extracts was $40.54 \pm 3.37\%$; $24.37 \pm 3.66\%$; $29.09 \pm 3.57\%$; $6.28 \pm 1.00\%$; $22.98 \pm 1.63\%$, respectively. The cytotoxic effect of filamentous fungi was: $60.53 \pm 2.50\%$; $67.33 \pm 1.51\%$; $19.68 \pm 6.62\%$; $19.68 \pm \text{NA}$; $23.38 \pm 7.16\%$; $17.30 \pm 10.59\%$; NA and NA. In the assay to evaluate leishmanicidal activity, the tested yeast extracts (for both species) and filamentous fungus extracts (for *L. chagasi*) were not lethal to the parasites even at the maximum tested concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$. The extracts 2FFLQ6 acetate and 2FFLQ6 acetone exhibited a maximum effect of $74.36 \pm 4.10\%$ and $84.62 \pm 5.32\%$ against the *L. amazonensis* species, suggesting the need for further studies in this area. In the patent review, patents from 2012-2022 that were within the thematic area were selected, which demonstrated activity against *L. major*, *L. amazonensis*, and *L. donovani* species, along with low toxicity. Despite the results, the subject is still underexplored by the scientific community, and the continuation and encouragement of bioprospecting research using fungal isolates and extracts is warranted.

Keywords: Antarctic fungi, Leishmanicidal activity, Leishmaniasis, Technological prospecting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo <i>L. longipalpis</i>	12
Figura 2 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	13
Figura 3 - Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago através de um microscópio eletrônico de varredura.	13
Figura 4 - Forma evolutiva extracelular: promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	14
Figura 5 - Forma evolutiva intracelular: amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 6 - Manifestações e classificações clínicas da leishmaniose.....	17
Figura 7 - Diferença entre o percentual de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 2020 em relação a 2019, países endêmicos da Região das Américas.	18
Figura 8 - Número de casos e incidência de leishmaniose visceral, países endêmicos da Região das Américas, 2018-2020.....	19
Figura 9 - Número de mortes e taxa de letalidade por casos de leishmaniose visceral, Região das Américas, 2012-2020.....	20
Figura 10 - Uma das expedições na Antártica.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Agente etiológico e vetores	11
2.2 Ciclo biológico	12
2.4 Epidemiologia	17
2.5 Tratamento Farmacológico	20
2.5 Antártica	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 PRODUTO 1	26
5 PRODUTO 2	45
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças infecciosas e negligenciadas, que apesar de serem amplamente distribuídas pelo mundo, os casos são mais registrados na África, Ásia e Américas, atingindo uma população que possui maior precariedade em relação aos serviços de saúde (OPAS/OMS, 2019). São causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, patógenos intracelulares que invadem as células fagocitárias do hospedeiro. São descritas aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*, onde destas, 31 são parasitos de mamíferos e 20 são patogênicas aos seres humanos. As espécies causam dois tipos de manifestações clínicas principais: leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV) (AKHOUNDI et al., 2016).

A doença é transmitida de forma vetorial, através do repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmea. De acordo com a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (SUS), a LT é uma manifestação clínica que apesar de infecciosa, apresenta baixa taxa de mortalidade (VASCONCELOS et al., 2018) quando comparada a LV, que é a forma mais grave da doença por atingir vísceras como o baço e o fígado, podendo levar a perda de função dos mesmos (SILVA et al., 2017).

De acordo com a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), nos últimos 20 anos foram notificados 1.067.759 casos de LT e LMC, com média de 53.387 por ano. Para LV foram registrados 67.922 novos casos, com uma média de 3.400 casos por ano. Foi observado que houve uma diminuição do número de casos no ano de 2020 de todas as manifestações clínicas, porém, não se sabe se essa diminuição pode estar relacionada com a interrupção total ou parcial das atividades de vigilância e assistência, devido a pandemia de COVID-19 (OPAS/OMS, 2021).

Para diagnóstico da doença é necessária uma anamnese sólida e existem diversos exames para a detecção de LT, que variam muito de sensibilidade e especificidade (CERUTTI et al., 2017). O diagnóstico parasitológico de aspirado de medula óssea e do baço, geralmente mostra a presença de formas amastigotas do parasito, sendo então considerados como padrão ouro na busca por LV (BRASIL, 2014).

Atualmente os fármacos disponíveis para as leishmanioses são cinco: antimoniais pentavalentes, anfotericina B e sua formulação lipossômica, a miltefosina, paramomicina e pentamidina. O tratamento medicamentoso tem por objetivo garantir a adesão ao tratamento, o alívio dos sintomas, a administração dos medicamentos com segurança e a diminuição dos efeitos adversos. Porém, eles estão associados a problemas graves como a alta toxicidade, administração prolongada e resistência parasitária (SANTIAGO; DA ROCHA; GUIMARÃES, 2019).

Devido a essa problemática e limitações encontradas na terapia medicamentosa para o tratamento das leishmanioses, se faz necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. Para isso, estudos vêm sendo realizados sobre a bioprospecção em ambientes antárticos, que assim como outras regiões extremas do planeta, possui inúmeras adversidades ambientais. Em substratos lacustres das Antártica, os fungos presentes sofrem influência direta dos limitantes abióticos e podem produzir substâncias bioativas de interesse agroindustrial, além de que podem ser produtores de metabólitos secundários com atividade biológica contra diversos patógenos (OGAKI, 2019).

Diante disso, estudos realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) em colaboração com o Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (LabMIP), ambos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), tem por objetivo buscar novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicida, a fim de que ao mesmo tempo que possuam uma boa eficácia contra o parasito, sejam menos citotóxicos do que os fármacos atualmente disponíveis no mercado e possuam um custo mais acessível. Desta forma, o presente estudo visou investigar a atividade leishmanicida de extratos pigmentados de fungos antárticos, além da produção de uma revisão patentária acerca da atividade leishmanicida de metabólitos fúngicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agente etiológico e vetores

As leishmanioses são atualmente classificadas como uma das mais importantes entre as doenças infecciosas negligenciadas (OMS, 2016). Elas formam um complexo de doenças causadas por protozoários heteroxênicos, pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (DE FREITAS, 2020).

O gênero *Leishmania* é formado por cerca de 30 espécies diferentes que são divididas em dois subgêneros, sendo eles *Viannia* e *Leishmania*. Esses são baseados no desenvolvimento do parasito no vetor, onde as leishmanias do subgênero *Leishmania* se desenvolvem na porção média e anterior do intestino do vetor, diferente dos parasitos do subgênero *Viannia*, que o desenvolvimento ocorre tanto na parte anterior e média, quanto no intestino posterior do inseto vetor (APRÍGIO, 2013).

Além dessa divisão, os parasitos também são classificados de acordo com as manifestações clínicas da doença e de desenvolvimento no hospedeiro como dermatrópicos e não dermatrópicos. As dermatrópicas ocorrem como leishmaniose tegumentar americana (LTA) que são as causadoras das formas mucosa, cutânea e mucocutânea. Já a leishmaniose visceral (LV), é dita como não dermatrópica (DE FREITAS, 2020).

As espécies responsáveis pelo complexo LTA, registradas no Brasil, são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) shawi* e *L. (Viannia) lindenbergi* (GUERRA et al. 2015). Já a LV é causada pela *L. (L.) chagasi* (FIGUEIREDO et al., 2010).

A transmissão da doença ocorre de forma vetorial através do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de flebotomíneos da ordem Díptera, família Psychodidae, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), sendo o principal transmissor da leishmaniose visceral o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (Figura 1), que dependendo da localização geográfica é conhecido popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (KILLICK-KENDRICK, 1999; BRASIL, 2014; VASCONCELOS, 2018).

Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo *L. longipalpis*.



Fonte: BRASIL, 2017.

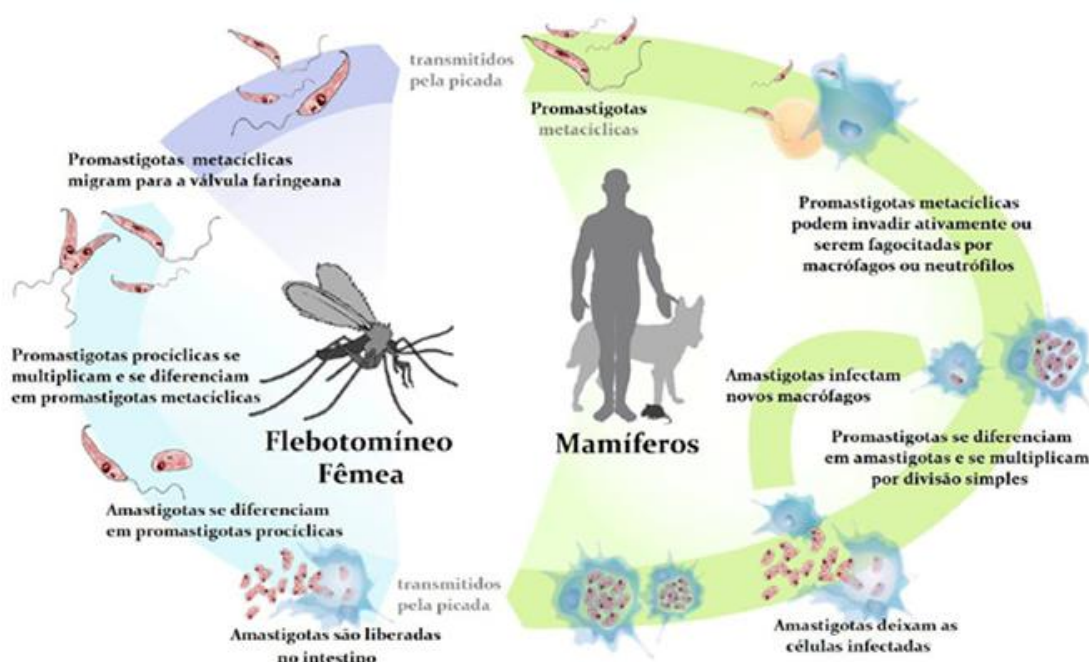
2.2 Ciclo biológico

O ciclo evolutivo da *Leishmania* spp. tem início quando as fêmeas de flebotomíneos já infectadas, realizam o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado liberando as formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania*, juntamente com sua saliva. Quando em contato com o hospedeiro, essas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No interior desta célula, no vacúolo parasitóforo, essas formas promastigotas (flageladas) se diferenciam em amastigotas (perdem o flagelo) e multiplicam-se até que haja o rompimento dos macrófagos. Após esse rompimento, essas formas amastigotas são liberadas no organismo e seguem para serem fagocitadas por outros macrófagos, ocorrendo a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011).

A infecção do vetor ocorre quando ele realiza o repasto sanguíneo no mamífero infectado e ingere macrófagos com as formas amastigotas e, em seu trato digestivo anterior,

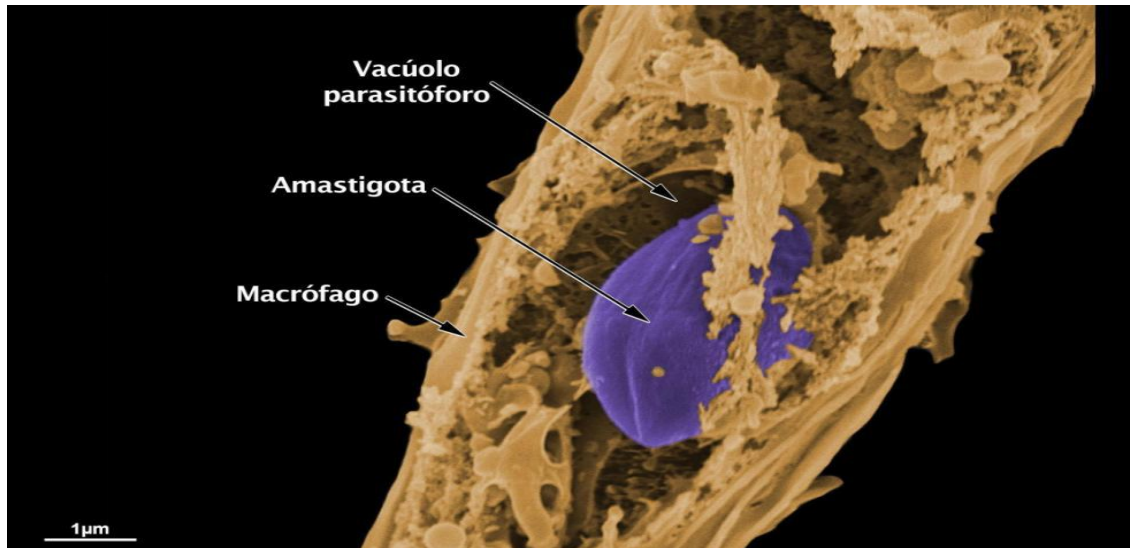
estes se rompem e liberam os parasitos, que por sua vez se alojam em diferentes partes do intestino médio, tornando-se agora a forma promastigota procíclica. Estas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, diferenciando-se a seguir em formas promastigotas metacíclicas infectantes. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (Figura 2, 3, 4 e 5) (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011; AFONSO, 2013).

Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



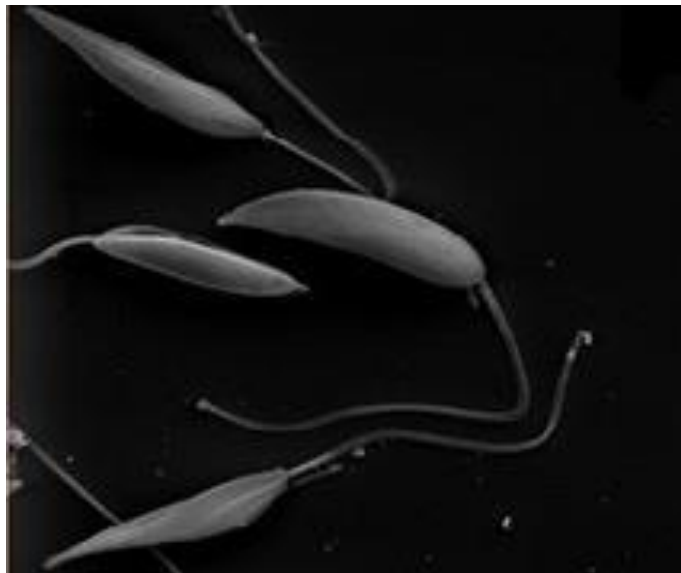
Fonte: HARHAY et al., 2011, p. 404

Figura 3 - Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago através de um microscópio eletrônico de varredura.



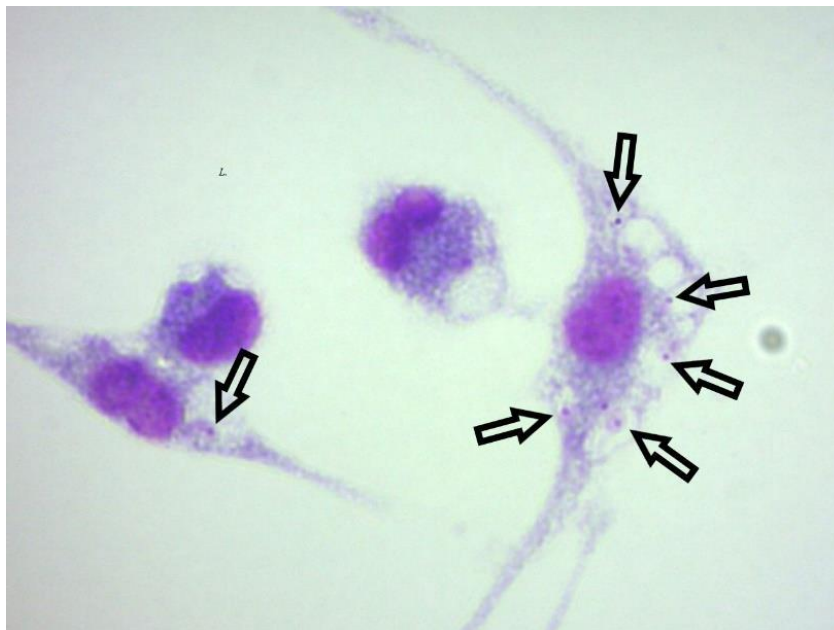
Fonte: RODRIGUES et al., 2008.

Figura 4 - Forma evolutiva extracelular: promastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: SILVA, 2014.

Figura 5 - Forma evolutiva intracelular: amastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: AUTORA, 2023.

2.3 Manifestações Clínicas

As leishmanioses possuem uma elevada variedade clínica e podem ser classificadas em LTA, que apresenta três formas clínicas específicas: a cutânea (LC), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC), e a LV. Para cada forma da doença existe uma variação que é caracterizada pelas manifestações clínicas, que por sua vez são resultados de fatores como características do parasito, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, que se tem por principal sua resposta imunológica (RATH et al., 2003; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LC não é dita como fatal ou que apresente risco de vida, mas gera uma morbidade estética, uma estigmatização social, efeitos psicológicos e requer atenção porque ela também pode ser considerada uma doença ocupacional (SKRABA et al., 2014). As lesões ocorrem no local onde foi a picada do flebotomíneo e se desenvolvem como uma pápula em um período de semana a meses, aumentando para a formação de nódulo que úlcera lentamente nos meses seguintes. As lesões podem apresentar prurido ou não, são indolores, com bordas bem delimitadas e no geral os pacientes estão sistematicamente bem (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

É a forma clínica mais frequente e suas lesões são únicas ou em pequeno número. Quando essas lesões passam a ser numerosas, elas caracterizam a leishmaniose cutânea disseminada (LCD), que é uma forma rara da LC. As lesões apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera este aspecto tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2017).

A LCD é uma forma grave e rara da LC que ocorre quando a infecção não é controlada pelos mecanismos adaptativos da resposta imune celular e evolui para o chamado polo anérgico-multiparasitário, no qual a anergia celular está associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção. A maioria dos casos tem origem com a infecção adquirida na infância, o que sugere a necessidade da imaturidade do sistema imune no desenvolvimento dessa forma clínica (BRASIL, 2010).

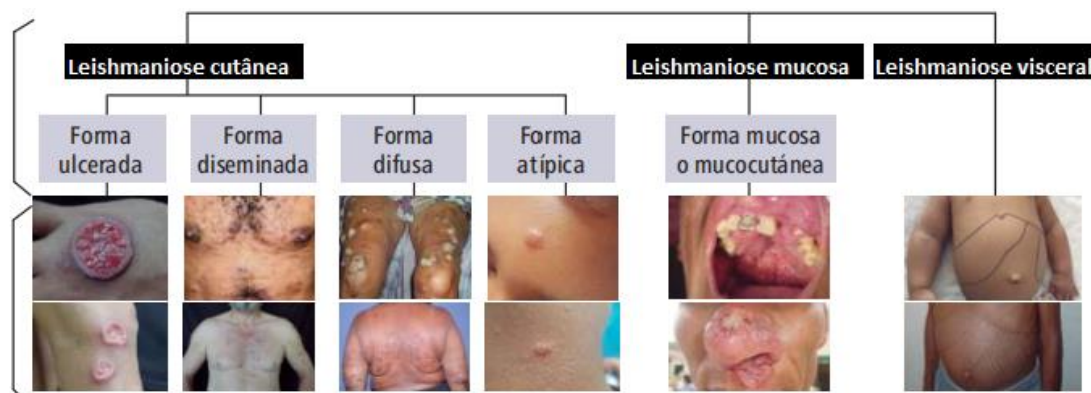
A LM caracteriza-se imunologicamente pelo exagero das respostas celulares antileishmania e pela escassez de parasitos. Clinicamente, ela é caracterizada por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores e sua forma mais comum é sendo secundária a lesão cutânea, visto que é com frequência que pacientes com LM relatam casos de LC crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com essa forma clínica não respondem bem ao tratamento, pois, mesmo que as lesões regridam ou desapareçam, as recidivas são frequentes (BRASIL, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave da doença por afetar órgãos e tecidos hematopoiéticos como fígado, baço, medula óssea, linfonodos etc. O período de incubação geralmente é entre 2 semanas a 2 meses, e quando não há tratamento, em 90% dos casos, o paciente pode chegar a óbito. A LV acomete principalmente crianças menores de cinco anos, idosos, pessoas que já possuem comorbidades e pode estar relacionada a aspectos nutricionais e outras condições de imunossupressão (OPS/OMS, 2019; OPAS/OMS, 2021).

A infecção pode ser sintomática, manifestando um quadro clínico leve, moderado ou grave. Como também pode ser assintomática, sem apresentar sinais e sintomas clínicos. No início, a doença pode ser confundida com outras e os sintomas mais frequentes são febre (constante ou irregular), esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, palidez mucocutânea

(causada por anemia grave) e perda de peso (geralmente de forma lenta) (Figura 6) (OPS/OMS, 2019; OPAS/OMS, 2021).

Figura 6 - Manifestações e classificações clínicas da leishmaniose.

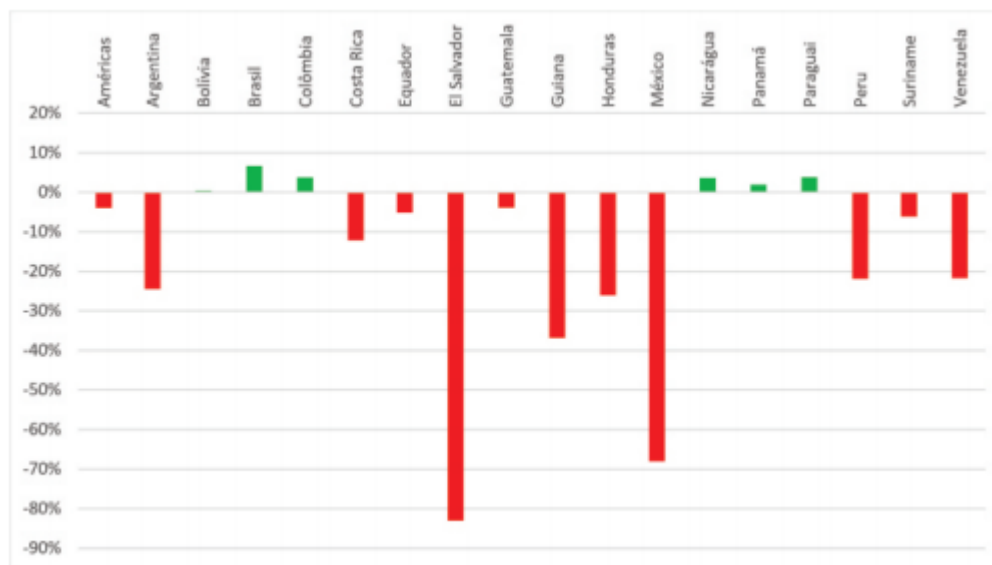


Fonte: OPS, 2019a, p.47

2.4 Epidemiologia

Casos de leishmaniose são registrados nos cinco continentes e ela é endêmica em 102 países (OPS/OMS, 2019). Nos últimos 20 anos, foram notificados a OPAS 1.067.759 casos de leishmaniose cutânea e mucosa, com uma média de 53.387 casos por ano. Nesse período é possível perceber uma diminuição no número de casos, principalmente entre 2019 e 2020, o que pode ser devido à interrupção das atividades de vigilância e assistência, em decorrência da pandemia de COVID-19. Em 2020, os países que notificaram o maior número de casos foram Brasil (16.432), Colômbia (6.161), Peru (4.178), Nicarágua (3.443) e Bolívia (Estado Plurinacional de) (2.059), que juntos representaram 81% dos casos da Região. Alguns países apresentaram uma redução no número de casos por 100.000 habitantes, como El Salvador (8,21), Colômbia (23,34), Guiana (2,09) e México (5,81), ou seja, uma diminuição da incidência de 83%, 75%, 63% e 56%, respectivamente. Por outro lado, observou-se um grande aumento na taxa de incidência por 100.000 habitantes em relação aos dados de 2019 na Guatemala (47,65), Peru (31), Costa Rica (16,77) e Paraguai (3,8), ou seja, um aumento na incidência de 55%, 49%, 48% e 45%, respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Diferença entre o percentual de casos de leishmaniose cutânea e mucosa em 2020 em relação a 2019, países endêmicos da Região das Américas.



Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2021.

Com relação aos casos de coinfeccção, nos últimos anos, tem sido observado uma tendência crescente no número de casos por LC/LM e HIV, com queda em 2016 e 2019. No entanto, em 2020, foi registrada a maior proporção de coinfectados desde 2012 (229), ano em que esta variável está disponível no SisLeish. Quatro países registraram casos de coinfeccção por LC/LM e HIV em 2020, Argentina (1), Brasil (131), Colômbia (63) e Peru (34).

A LV, que é a forma mais grave da doença, é endêmica em 13 países das Américas, onde foram registrados 67.922 novos casos de 2001 a 2020, com uma média de 3.400 casos por ano. Em 2020, do total de casos, 97% (1.933) foram notificados pelo Brasil, e os demais casos pela Argentina, Bolívia (Estado Plurinacional de), Colômbia, Paraguai, Venezuela (República Bolivariana) e Uruguai. Dos 13 países com transmissão de LV, sete relataram casos ao SisLeish em 2020, distribuídos em 44 unidades do primeiro nível administrativo subnacional e 720 unidades do segundo nível, com uma redução geográfica dos casos. A incidência de LV, considerando a população das zonas de transmissão da Região, foi de três casos por 100.000 habitantes, o que mostra que, apesar da diminuição dos casos em número e distribuição geográfica, a incidência aumentou. O aumento da incidência deve-se ao aumento

no Brasil e no Paraguai, enquanto os demais países apresentaram redução na incidência (Figura 8) (OPS, 2021).

Figura 8 - Número de casos e incidência de leishmaniose visceral, países endêmicos da Região das Américas, 2018-2020.

Países	2018				2019				2020			
	Nº	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	Nº	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²	Nº	%	Incid. Pop Risco ¹	Incid. Geral ²
Argentina	2	0,06	0,49	0	9	0,35	0,94	0,02	11	0,55	0,86	0,02
Bolívia	0	0,00	0	0	1	0,04	1,54	0,01	2	0,10	0,11	0,02
Brasil	3466	97,30	5,05	1,66	2529	97,16	3,08	1,2	1933	97,23	3,23	0,91
Colômbia	16	0,45	2,65	0,03	11	0,42	6,99	0,09	8	0,40	0,87	0,02
El Salvador	3	0,08	1,16	0,05	0	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0
Guatemala	4	0,11	2,64	0,02	1	0,04	2	0,01	0	0,00	0,00	0
Honduras	8	0,22	8,35	0,09	3	0,12	11,16	0,03	0	0,00	0,00	0
México	0	0,00	0	0	1	0,04	0,16	0	0	0,00	0,00	0
Paraguai	19	0,53	1,47	0,29	22	0,85	1,35	0,33	26	1,31	1,47	0,45
Uruguai	1	0,03	0,75	0,03	3	0,12	2,25	0,09	2	0,10	1,77	0,07
Venezuela	43	1,21	1,64	0,14	23	0,88	1,08	0,07	6	0,30	1,03	0,02
Total	3562	100	4,8	0,62	2603	100	2,96	0,47	1988	100	3	0,34

Notas:

Taxa de incidência: número de casos por 100.000 habitantes por área de transmissão.

¹ População de áreas de transmissão.

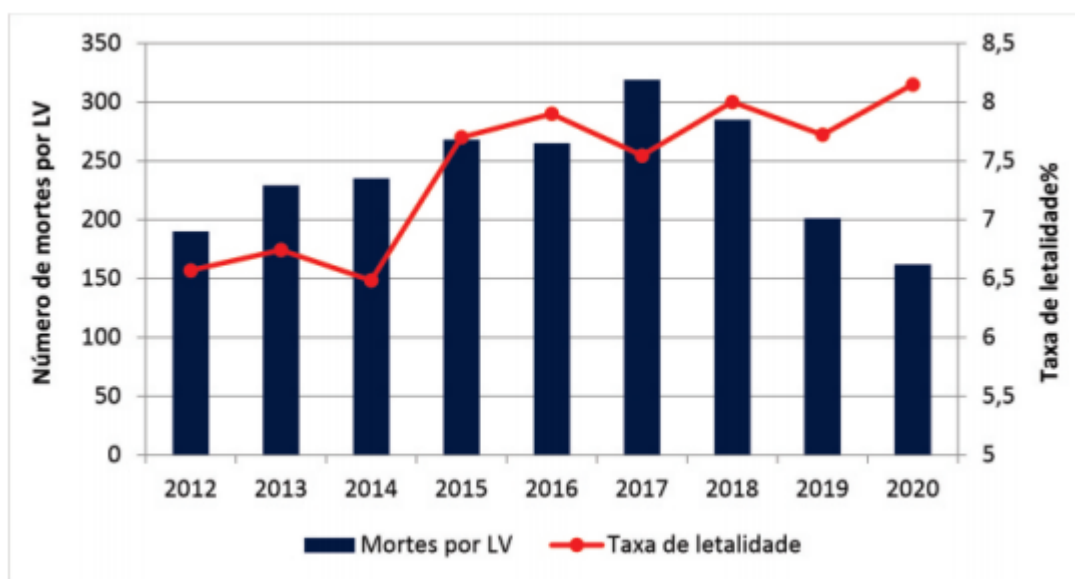
² População total do país.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2021.

Os casos de coinfeção por LV e HIV na região tem crescido desde 2012, onde a maior proporção foi registrada em 2020 (12,4%), com 247 casos. Destes, 242 (98%) foram notificados pelo Brasil; 4 (1,61%), Paraguai e 1 (0,4%), Uruguai. Por outro lado, as maiores proporções de casos de coinfeção por LV e HIV foram registradas no Uruguai (50%), seguida pelo Paraguai (15,4%) e Brasil (12,5%). Esse aumento pode ser devido ao teste rápido de HIV que está sendo indicado para pacientes com LV e está disponível nesses países (OPS, 2021).

Quanto à evolução dos pacientes, 64,3% se recuperaram, 8,15% morreram da doença e 3,5%, de outras causas. Chama a atenção que, em 24,04% dos casos, essa informação não está disponível, o que é reflexo da ausência de dados na Argentina (90,91%), Brasil (23,23%) e Paraguai (73,08%). A taxa de letalidade mantém uma tendência crescente e, em 2020, foi reportada a maior taxa desde 2012, três vezes maior que a taxa global de letalidade de LV de 2,7% (4). No total, foram notificados 162 óbitos, sendo o grupo mais afetado homens (72%) e maiores de 50 anos (40%), seguidos pela faixa etária de 20 a 50 anos (36,4%) e menores de 5 anos (16%) (Figura 9) (OPS, 2021).

Figura 9 - Número de mortes e taxa de letalidade por casos de leishmaniose visceral, Região das Américas, 2012-2020



Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2021.

2.5 Tratamento Farmacológico

O tratamento da leishmaniose precisa ser feito de forma individualizada e alguns fatores como a forma da leishmaniose, a espécie da *Leishmania* que a causou, a gravidade potencial do caso e a saúde subjacente do paciente, precisam ser considerados. As feridas causadas pela leishmaniose cutânea, geralmente cicatrizam sozinhas, mesmo sem tratamento. Já para os casos de leishmaniose visceral, se o paciente não for tratado, pode evoluir para casos graves, que geralmente são fatais (CDC, 2020).

No ano de 1913, Gaspar Vianna utilizou compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar, e dois anos depois o medicamento foi usado para tratar leishmaniose visceral. Os derivados pentavalentes N-metil glucamina (Sb^{+5}) só foram introduzidos na década de 40 e, desde então, eles são considerados como fármacos de primeira escolha (BRASIL, 2014).

Atualmente, as formulações disponíveis no mercado são estibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina, sendo esse último o único disponível no Brasil e que é

distribuído pelo Ministério da Saúde (MS) em ampolas de 5 mL, contendo 405mg de Sb^{+5} (1 ml = 81mg de Sb^{+5}). As ampolas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz, para evitar problemas na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2014).

Ainda não há estudos suficientes para explicar de forma totalmente clara sobre o seu mecanismo de ação, porém, sabe-se que ele atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Estudos mostram que esses compostos são rapidamente eliminados da circulação através dos rins (BRASIL, 2014).

Efeitos adversos como náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, febre, choque pirogênico e edema são observados em pacientes que fazem o uso sistêmico. De acordo com o Ministério da Saúde, as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, pois, podem apresentar toxicidade e causar alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas ou renais que indiquem modificação ou interrupção do tratamento (BRASIL, 2017), o que consequentemente gera o aumento da resistência parasitária devido a essas falhas na terapia (RATH et al., 2003; SERENO et al., 1998).

A anfotericina B desoxicolato é um antifúngico de amplo espectro, e ativo contra espécies de *Leishmania*, sendo seu mecanismo de ação baseado na afinidade pelo ergosterol, que é um esteroide constituinte da membrana celular. O fármaco se liga aos esteróis de membrana formando complexos que se organizam em canais iônicos e aumentam a permeabilidade da membrana, o que leva a perda de componentes importantes para a sobrevivência do parasito (ROATT et al., 2020).

Apesar da sua eficácia, os pacientes tratados com anfotericina apresentam efeitos adversos frequentes como febre, hipocalemia, miocardite e principalmente nefrotoxicidade, que exigem acompanhamento hospitalar. Na tentativa de reduzir a toxicidade, foram feitas formulação lipídicas, porém, só a anfotericina B lipossomal é aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA. Essa formulação apesar de possuir um custo alto, apresenta boa eficácia e é a primeira escolha de tratamento para pacientes com coinfeção por HIV, gestantes e indivíduos transplantados na maioria dos países (ROATT et al., 2020).

Um outro fármaco que também é utilizado como segunda escolha para o tratamento é a pentamidina, que são diaminas aromáticas e seu mecanismo de ação ocorre pela inibição de

diferentes processos celulares (WYREPKOWSKI et al, 2020). O isotionato de pentamidina é administrado pela via intramuscular ou por infusão intravenosa e as reações adversas mais comuns são dor, induração e abscessos estéreis, se aplicação IM, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2017).

Entre as reações adversas mais graves estão pancreatite, arritmias cardíacas, leucopenia, trombocitopenia, insuficiência renal aguda, hipocalcemia e taquicardia ventricular e choque anafilático. O medicamento é contraindicado para gestantes e o paciente em uso precisa monitorar a sua função renal, pancreática e realizar eletrocardiograma e glicemia antes, durante e no final do tratamento (BRASIL, 2017).

A miltefosina, um fármaco antineoplásico, é o único que é utilizado contra leishmaniose e administrado por via oral, e seu uso normalmente é combinado com outros medicamentos, como a pentamidina (SOTO et al., 2018). Acredita-se que o fármaco possua mais de um sítio de ação e envolve a alteração das vias de sinalização, a perturbação do metabolismo lipídico levando morte celular por apoptose. Estudos mostram que após uma década de uso houve um aumento da resistência parasitária, e a eficácia foi reduzida possuindo a taxa de recaída dobrada (ROATT et al., 2020).

Outro fármaco que pode ser usado para tratar a leishmaniose em sua forma cutânea é a paramomicina, que é um antibiótico aminoglicosídeo que interfere na síntese de proteínas e altera a fluidez da membrana mitocondrial, inibindo a respiração. Pode ser usada tanto para o tratamento tópico quanto sistêmico da LC, e sistêmico da LV (ROATT et al., 2020).

Atualmente os medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, principalmente a visceral, não apresentam vantagens, sendo de custo elevado e com muitos efeitos adversos, por isso pesquisas que visem encontrar fármacos que supram essa necessidade, se fazem necessárias, como por exemplo, as pesquisas realizadas com microrganismos da Antártica.

2.5 Antártica

A Antártica é um continente de características bem específicas, com aproximadamente 14 milhões de quilômetros quadrados, clima e vegetação uniforme, sendo o clima frio e seco. O continente é uma das regiões mais sensíveis às alterações climáticas globais e por possuir interações diretas com o planeta, faz com que sua região influencie no clima de toda a Terra. A Antártica não possui população permanente, apenas uma provisória, formada por cientistas e pessoas que ficam no apoio das bases, pois, em 1959, países de todo o mundo assinaram um contrato que faz do continente uma zona desmilitarizada e local de pesquisa científica (FIOANTAR, 2020).

O Brasil tem um programa chamado Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), que foi criado em 1982 com o objetivo de promover a pesquisa científica na região antártica e garantir ao País a condição de Membro Consultivo do Tratado da Antártica, que assegura a plena participação do Brasil nos processos de decisão relativos ao futuro do continente (BRASIL, 2020) (Figura 10). Essa região extrema do planeta possui uma vasta adversidade ambiental como baixas temperaturas, disponibilidade de água, ciclos de congelamento e descongelamento e alta incidência de radiação ultravioleta (OGAKI, 2019).

Figura 10 - Uma das expedições na Antártica.



Fonte: PROANTAR, 2021

Estudos sobre a taxonomia, diversidade e biotecnologia dos fungos provenientes da Antártica ainda são limitados, o que se sabe é que esses fungos são adaptáveis a temperaturas

inferiores a 0 °C e os mais estudados até o momento são os provenientes de solo, plantas líquens e macroalgas (OGAKI, 2019).

Os fungos sempre foram utilizados como fontes de diferentes metabólitos secundários bioativos e são considerados produtores de moléculas que podem ser usadas como moldes para desenvolver novos medicamentos ou pesticidas. Atualmente, diferentes programas de pesquisa em bioprospecção utilizam fungos presentes em ambientes inexplorados como fonte e estratégia para encontrar novas vias metabólicas (GONÇALVES et al., 2015).

De acordo com estudos de bioprospecção, diferentes organismos com potencial de uso em processos biotecnológicos têm sido identificados, evidenciando que microrganismos, incluindo os fungos, podem ser fontes promissoras de novos fármacos. O fato de fungos antárticos conseguirem sobreviver a condições extremas sugere que eles podem exibir rotas bioquímicas incomuns, o que pode lhe permitir gerar novos compostos (ROSA et al., 2019). Na literatura há estudos que sugerem que produtos naturais derivados de organismos polares podem apresentar atividade antiproliferativa e antibiótica que podem ter impacto nas áreas oncológicas, de doenças infecciosas e outras (TRIPATHI et al., 2018).

Entre os fungos bioativos encontrados nessa região, Brunati et al. (2009) encontraram espécies de *Penicillium* com capacidade de produzir compostos citotóxicos e antimicrobianos. De acordo com Godinho et al. (2013), o extrato de *P. chrysogenum* isolado da macroalga endêmica da Antártica, *Palmaria decipiens*, apresentou atividade contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com 100% de inibição, porém o trabalho não especifica a concentração. Estudos mais antigos como o de Li e colaboradores. (2008), mostram que os isolados de geomicinas B e C de *Geomyces* sp., obtidos do solo da Antártica, demonstrou possuir atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Apesar da riqueza do continente Antártico, poucos estudos foram realizados em busca de metabólitos secundários bioativos produzidos por microrganismos, e conseqüentemente ainda não há nenhum medicamento disponível no mercado proveniente desses microrganismos. Portanto, é necessário mais estudo a respeito da temática.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade de candidatos a fármacos leishmanicidas à base de extratos de fungos antárticos, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose, e realizar uma revisão patentária acerca do potencial leishmanicida de metabólitos fúngicos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar pesquisa de prospecção tecnológica sobre bioprodutos fúngicos no tratamento da leishmaniose;
- Determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos);
- Avaliar a potência de ação dos extratos, através da determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento de promastigotas de *Leishmania* spp. para cada extrato a ser testado;
- Realizar uma revisão patentária acerca do potencial leishmanicida de metabólitos fúngicos.

4 PRODUTO 1

Bioprospecção de extratos pigmentados de fungos da Antártica visando à descoberta de protótipos leishmanicidas

Hilda Caroline do Nascimento Santos^(1,2), Aline Cavalcanti de Queiroz^(1,2,3), Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira⁽²⁾, Camilla Amanda de Oliveira Gomes⁽²⁾, Márcio Thomaz dos Santos Varjão⁽²⁾, Anderson Leite Brandão⁽²⁾, Andressa Letícia Lopes da Silva⁽²⁾, Lilyana Waleska Nunes de Albuquerque⁽²⁾, Izabelly Carolynny Maciel Nunes⁽²⁾, Cledna Kaline dos Santos⁽³⁾, Adeildo Júnior de Oliveira⁽³⁾, Maria Nicolle Pereira da Silva⁽³⁾, Alysso Wagner Fernandes Duarte⁽³⁾, Luiz Henrique Rosa⁽⁴⁾, Magna Suzana Alexandre Moreira^(1,2).

Afiliação

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.
2. Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.
3. Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Complexo de Ciências Médicas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brasil.
4. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Autor correspondente: Magna Suzana Alexandre Moreira. Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brasil. E-mail: suzana.magna@gmail.com

Introdução e objetivos

As doenças tropicais negligenciadas ainda são um problema de saúde pública que interfere na vida e bem-estar de uma grande parte da população. Doenças como a leishmaniose, necessitam de um arsenal terapêutico que seja mais eficaz do que os que já existem atualmente no mercado. Desta forma, o presente estudo sobre a bioprospecção de extratos pigmentados de

fungos da Antártica, que é uma região pouco explorada e rica em diversidade de microrganismos, visa investigar a atividade de candidatos a fármacos leishmanicidas.

Materiais e métodos

Amostras de fungos foram coletadas na Antártica e os isolados foram cultivados para a produção da biomassa. Os pigmentos foram extraídos com etanol e metanol (no caso das leveduras), acetato de etila e acetona (os fungos filamentosos) e posteriormente foram secos com a ajuda de um dessecador a vácuo e rotaevaporador, respectivamente. A citotoxicidade dos extratos foi avaliada em macrófagos da linhagem J774.A1 através do ensaio de MTT. A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada em promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, através da contagem direta com o auxílio de um microscópio óptico.

Resultado e discussão

Foram selecionadas e produzidas 5 leveduras: 19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19, e 6 fungos filamentosos: 4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetato, 2FFLQ6 acetona, 1EMP1, 3EMP4, 2EMP4. Os testes foram realizados nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio de MTT, o efeito citotóxico máximo encontrado dos extratos de leveduras foi de $40,54 \pm 3,37\%$; $24,37 \pm 3,66\%$; $29,09 \pm 3,57\%$; $6,28 \pm 1,00\%$; $22,98 \pm 1,63\%$, respectivamente. O efeito citotóxico dos fungos filamentosos foi de: $60,53 \pm 2,50\%$; $67,33 \pm 1,51\%$; $19,68 \pm 6,62\%$; $19,68 \pm 6,62\%$; $23,38 \pm 7,16\%$; $17,30 \pm 10,59\%$; $29,08 \pm 18,80\%$ e NA. Já no ensaio para avaliar a atividade leishmanicida, os extratos de leveduras testados (nas duas espécies) e de fungos filamentosos (para *L. chagasi*) não conseguiram ser letais para os parasitos até a máxima concentração testada, que foi 100 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona apresentaram efeito máximo de $74,36 \pm 4,10\%$ e $84,62 \pm 5,32\%$ contra a espécie de *L. amazonensis*.

Conclusão

Os extratos demonstraram possuir citotoxicidade menor do que a do fármaco padrão utilizado. Frente as espécies do parasito, os extratos pigmentados 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona foram letais para *L. amazonensis* com CI_{50} de $35,35 \pm 4,52$ e $30,61 \pm 5,46$ $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave

Fungos antárticos, atividade leishmanicida, leishmaniose, prospecção

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que são aquelas ocasionadas por patógenos infecciosos, são responsáveis por graves problemas de saúde pública global, e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) afetam cerca de um bilhão de pessoas em 149 países. Os atuais esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento dessas doenças apresentam diversas limitações, dentre elas a toxicidade e a resistência (BRANCO et al., 2020).

Nos últimos anos, várias inovações mostraram uma boa disposição na busca de se descobrir e desenvolver novos medicamentos para o tratamento das DTNs, no entanto, apesar dos esforços, essa busca por novas alternativas para o controle e a eliminação dessas doenças, continua sendo uma tarefa difícil. Uma das fontes utilizadas, são os produtos naturais, já que desde a antiguidade que eles são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos (CONRADO et al., 2022).

A busca por essas fontes em ambientes pouco explorados, pode ser a solução para lidar com o problema, e ambientes antárticos são locais valiosos para esse tipo de exploração. A Antártica é uma terra pouco explorada e possui uma diversidade de microrganismos, onde podem ser descobertas novas substâncias ativas ou novos microrganismos produtores (DANILOVICH et al., 2018).

Microrganismos fúngicos são fontes promissoras de novos produtos farmacêuticos, pois são organismos capazes de produzir diferentes metabólitos secundários bioativos, e fungos oriundos da Antártica apresentam diferentes atividades biológicas como antioxidantes, antimicrobiana, antiprotozoária, antiviral, inseticida e herbicida. Sua capacidade de sobreviver em ambientes extremos pode ser eficaz nessa busca por novos candidatos a fármacos com diversas atividades, incluindo contra as DTNs (DE MENEZES et al., 2019; ROSA et al., 2019).

Diante disto, o presente estudo foi realizado tendo por objetivo produzir extratos pigmentados de leveduras e fungos filamentosos isolados da Antártica e avaliar suas atividades frente a macrófagos de linhagem J774.A1, além de seus possíveis potenciais leishmanicidas contra *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção dos extratos de leveduras e fungos filamentosos

Obtenção das leveduras e fungos filamentosos

As amostras coletadas na Antártica de isolados de líquens foram cedidas pelo Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte (Campus Arapiraca/UFAL), participante do projeto MycoAntar: Diversidade e Bioprospecção de Fungos da Antártica.

Produção da biomassa de leveduras

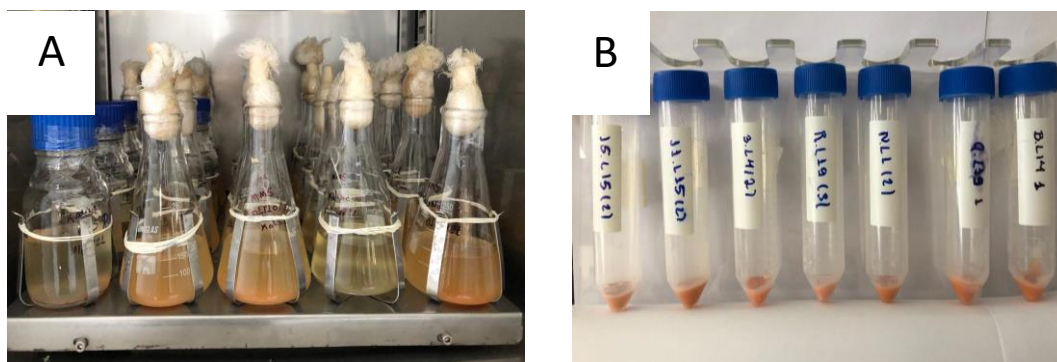
Inicialmente foi realizada a reativação dos isolados de leveduras, que estavam no acervo do Laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia (LABMIP) – UFAL/Campus Arapiraca, em criopreservação em ultra freezer à -80 °C. Os isolados foram cultivados em meio Ágar Sabouraud, incubadas à 15 °C por sete dias e, após o crescimento, foram selecionadas 5 leveduras, levando em consideração sua coloração para a produção dos extratos (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de leveduras isoladas de líquens da Antártica utilizadas na prospecção de metabólitos leishmanicidas.

Identificação (Espécie)	Código	Líquén de isolamento	Local de coleta	Cor
-	19L15	<i>Polycauliona regalis</i> (Vain.) Hue	Refúgio Ipanema – Ilha Rei George 62°05.314'S 058°25.178 W	Amarelo
-	4L2	<i>Usnea aurantiacoatra</i> (Jacq.) Bory	Refúgio Ipanema – Ilha Rei George 62°05.314'S 058°25.178'W	Amarelo
<i>Candida davisiana</i>	2L19	<i>Lecania brialmontii</i> (Vain.) Zahlbr. (L19)	Ilha Dee 62o25.461'S 059o46.117'W	Laranja
<i>Dioszegia</i> sp	NL1	<i>Usnea aurantiacoatra</i> (Jacq.) Bory	Ilha Rei George	Laranja
<i>Cystobasidium alpinum</i>	GL19	<i>Lecania brialmontii</i> (Vain.) Zahlbr. (L19)	Ilha Dee 62o25.461'S 059o46.117'W	Laranja- rosado

As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio de cultura líquido (MMS), a composição do meio considera glicose – 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{-2}$ g/L; $\text{KH}_2(\text{PO}_4)^{-2}$ g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^{-0.5}$ g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^{-0.1}$ g/L; extrato de levedura – 1 g/L, em pH 5,0 (LIBKIND; VAN BROOCK, 2006). Em seguida, houve a padronização do inóculo em leitura no espectrofotômetro, com absorvância variando entre 0,9 e 1,0 em 600 nm de comprimento de onda em UV/VIS. Assim, 3 mL foram inoculados em meio líquido, sendo depositado em incubadora Shaker sob agitação de 120 rpm, a 15°C por 7 dias (Figura 1A). Logo após o crescimento das leveduras, o conteúdo dos Erlenmeyers foi transferido para tubos de polipropileno tipo Falcon esterilizado de 50 mL, sendo realizada a centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Os *pellets* (Figura 1B) foram armazenados em freezer para posterior extração e secagem.

Figura 1 - Produção de biomassa de leveduras da Antártica.



Fonte: AUTORA, 2023.

Legenda: A) Agitação a 120 rpm e 15 °C; B) Biomassa das leveduras.

Extração dos pigmentos

Os pigmentos intracelulares das leveduras codificadas como 19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19 foram extraídos de acordo com sua polaridade, utilizando os solventes etanol (4L2) e metanol (19L15, 2L19, NL1 e GL19). Sendo adicionado entre 10 e 30 mL dos solventes supracitados, seguidamente de agitação em vórtex na velocidade máxima. Os isolados que não apresentaram solubilidade eficiente sob as condições citadas, foram submetidos a banho-ultrassônico a fim de potencializar a lise celular, por cerca de 1 hora. Posteriormente, foram

submetidos a centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon estéril de 50 mL, e esse processo foi repetido até o branqueamento do *pellet*. Após, os extratos foram secos em um dessecador, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, com auxílio de uma bomba de vácuo. Depois de secos, os extratos foram ressuspendidos em DMSO, na concentração de 100 mg/mL e 50 mg/mL e filtrados com filtros de seringa com porosidade de 0,22 µm para esterilização.

Produção da biomassa de fungos filamentosos

Foram reativados fungos filamentosos (Tabela 2) que também estavam no acervo do (LABMIP) – UFAL/Campus Arapiraca, em criopreservação em ultra freezer à -80 °C. Os fungos foram cultivados em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose em placas de Petri através de alças microbiológicas. Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas na estufa à 30 °C por 7 dias. Após o crescimento, foram selecionados 6 fungos codificados em 2EMP4, 3EMP4, 2FFLQ6, 4FFLQ2, 5YP4 e 1EMP1, e preparado novamente o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose – 65 g/L, que foi adicionado 20 mL em cada placa Petri.

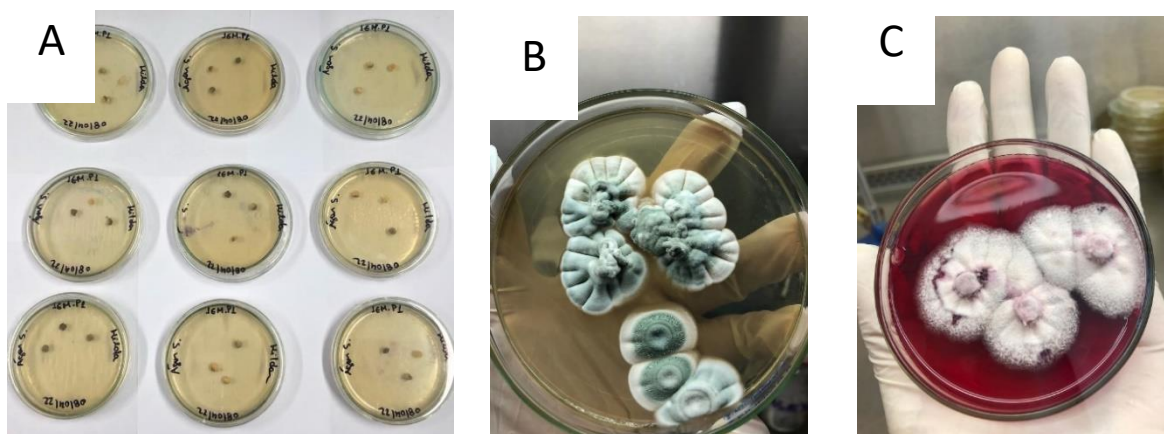
Tabela 2 - Isolados de fungos filamentosos isolados de líquens e sedimentos da Antártica, utilizados na prospecção de metabólitos leishmanicidas.

Identificação	Código	Isolamento	Local de coleta	Cor
-	2EMP4	Liquen amarelo	Ilha Rei George, <i>Punta Hanequin</i>	Amarelo dourado
-	3EMP4	Liquen amarelo	Ilha Rei George, <i>Punta Hanequin</i>	Amarelo
<i>Cladosporium</i> sp.	2FFLQ6	Liquen Usnea / Ramalina	Ilha Rei George, <i>Punta Hanequin</i>	Vermelho vinho
-	4FFLQ2	Liquen cinza	Ilha Rei George, <i>Punta Ullmann</i>	Vermelho vinho
<i>Penicillium</i> sp.	5YP4	Sedimentos	Ilha <i>Deception, Whaleys Bay</i>	Amarelo
<i>Cladosporium</i> sp	1EMP1	Sedimentos	Ilha <i>Deception, Whaleys Bay</i>	Laranja

Foram realizadas replicatas dos fungos (Figura 2) no intuito de ser obter uma grande quantidade de biomassa, e conseqüentemente, mais pigmentos, sendo furados 3 discos dos

fungos e transferidos para a nova placa de Petri. Após esse processo, as placas foram vedadas e incubadas à 15 °C na DBO por 14 dias.

Figura 2 -Fungos antárticos reativados.



Fonte: AUTORA, 2023.

Legenda: A) Replicatas de fungos filamentosos em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, prontas para serem incubadas à 15°C na DBO. B) Crescimento de fungos filamentosos após 14 dias incubados na DBO à 15°C.

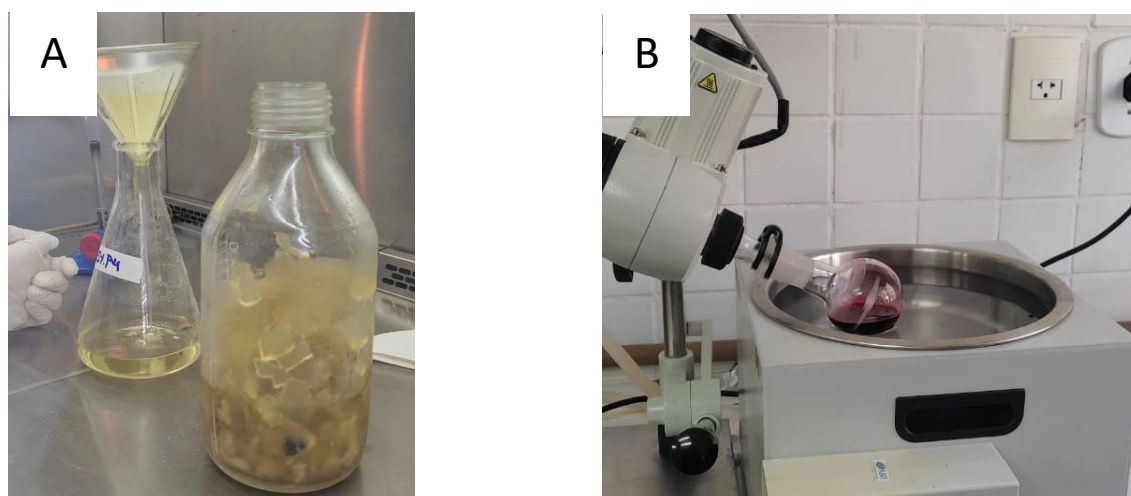
Extração dos pigmentos

Após os 14 dias em que os fungos ficaram em processo de crescimento, foi realizada a extração dos pigmentos. Com o auxílio de uma espátula, o meio junto com o fungo foi repartido em pedaços pequenos que foram transferidos para Erlenmeyers ou garrafas (com a identificação de cada fungo). Foi adicionado o solvente acetato de etila, em uma proporção de 100 mL para cada 6 placas contendo o mesmo tipo de fungo.

Após o término desse processo, cada erlenmeyer (ou frascos tipo *schott*) foi vedado e coberto com papel alumínio e armazenado na geladeira por 7 dias. Após o período da extração, os fungos deixados no acetato de etila foram transferidos para outros Erlenmeyers através de um funil com papel filtro (Figura 3A). Em seguida, foi realizada a concentração dos pigmentos das amostras (Figura 3B), onde foi adicionado Na_2SO_4 em cada amostra, para diminuir a solubilidade, provocando movimentos circulares, filtrado novamente e colocada as amostras em um balão de fundo redondo, que por sua vez foi colocado no rotaevaporador para fazer o

solvente evaporar e concentrar o pigmento das amostras no fundo do balão. Para secagem, foram colocados no dessecador à vácuo, sob ausência da luz. Depois de secos, os extratos foram ressuspensos em DMSO, na concentração de 100 mg/mL.

Figura 3 – Processo de preparação dos extratos fúngicos.



Fonte: AUTORA, 2023.

Legenda: A) Processo de filtração. B) Concentração dos pigmentos.

Experimentos farmacológicos

Após a produção dos pigmentos de leveduras e fungos filamentosos, foram realizados os ensaios farmacológicos (citotoxicidade e leishmanicida) no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) – UFAL/ Campus A. C. Simões, coordenado pela Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

Manutenção da linhagem de células

Foram utilizados macrófagos da linhagem J774.A1 que foram mantidos em garrafas de cultura em 10 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640) suplementado com L-glutamina, piruvato, aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (Roche), e mantidos em estufa a 37 °C com 95% de umidade e 5% CO₂.

Ensaio de viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^4 células/poço e incubadas *overnight* em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e posteriormente preenchidos em triplicata com 200 µL dos extratos testados diluídos em meio RPMI nas concentrações de 100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 µg/mL e reincubados por 48h. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB ou células cultivadas na presença do diluente dos extratos (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de Metiltetrazolium (MTT), que consiste na redução deste sal a cristais de formazan por células viáveis e posterior leitura em espectrofotômetro a 550 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular das culturas tratadas com os extratos testados foi determinada comparando cada tratamento ao padrão de viabilidade obtido nas culturas controle (DMSO).

Parasitas

Foram utilizadas cepas *L. amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) que foram obtidas com o Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz), e *L. chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) que foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges (Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz – BA). As formas promastigotas foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio Schneider com 10% de SFB e suplementado com 2% de urina humana e 2 mM de L-glutamina, armazenadas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 27 °C.

Ensaio de viabilidade de promastigotas de Leishmania

As formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em fase exponencial tardia de crescimento, foram centrifugadas e posteriormente resuspensas em meio Schneider suplementado, para obter uma concentração de 1×10^5 parasitos/mL. Em seguida, alíquotas de 100µL dessa suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionadas em triplicatas, diferentes concentrações dos extratos (100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 µg/mL) e anfotericina b (100 a 0,001 µM), como também o controle de veículo DMSO (0,1% e 0,2%) preparadas em meio Schneider suplementado, para alcançar um volume final de

200µL por poço. A placa então foi incubada em estufa DBO a 27 °C por 48 horas. Após esse período, o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer, em microscópio óptico. A inibição causada por cada extrato foi expressa como uma porcentagem em relação às células cultivadas apenas na presença do veículo DMSO.

Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio *in vitro* foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett, utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Os dados foram considerados significativos quando *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001 em relação ao diluente dos extratos DMSO 0,1% e/ou 0,2%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção da biomassa através de isolados de fungos antárticos, permitiu a obtenção dos pigmentos, que por sua vez teve o objetivo de serem testados para uma possível avaliação leishmanicida.

Foram selecionadas 5 leveduras: 19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19, e 6 fungos filamentosos: 2EMP4, 3EMP4, 2FFLQ6, 4FFLQ2, 5YP4 e 1EMP1. Nas leveduras, a extração foi realizada com metanol, com exceção da levedura 4L2, cujo extrato obtido foi etanólico.

Em relação aos fungos filamentosos, estes foram identificados e tiveram seu pigmento extraído através do solvente acetato de etila, e no caso de dois fungos filamentosos (2FFLQ6 e 1EMP1), foi utilizado também para teste a acetona, como solvente. O objetivo também era avaliar qual solvente conseguiria extrair melhor e possibilitar a concentração do pigmento, justificando o uso de dois solventes.

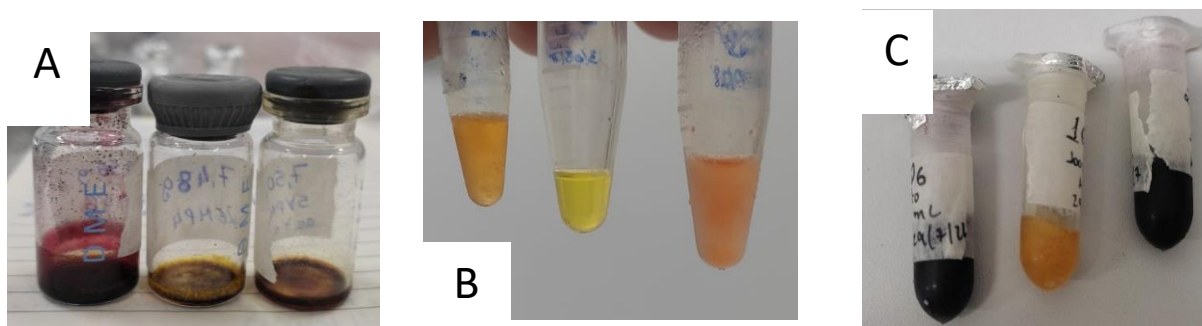
Em alguns fungos em que foi utilizado como solvente o acetato de etila para extração, foi necessário adicionar NaCl para ajudar a remover o resíduo de água que estava presente. No caso do 2FFLQ6, a extração foi realizada com solvente acetona, para conseguir concentrar o pigmento (após a extração), além de ter sido adicionado NaCl, em seguida foi preciso adicionar acetato de etila para o pigmento se deslocar para a fase orgânica, separando-o da

água, e usando um funil de separação para separar as duas fases e só então rotaevaporar, para ser possível obter somente o pigmento.

No caso do 1EMP1 e 4FFLQ2 (com solvente acetona), foi realizado o mesmo processo, porém mesmo assim, o pigmento permaneceu na fração aquosa, além de que não foi possível identificar se o que foi extraído de 1EMP1 foi pigmento ou se a coloração era proveniente de seu meio de cultura.

Após obter os extratos, foi realizada a secagem para que pudessem ser diluídos em DMSO e testados no ensaio de citotoxicidade e leishmanicida frente as formas promastigotas (Figura 4).

Figura 4 – Obtenção dos extratos fúngicos.



Fonte: AUTORA, 2023.

Legenda: A) Rendimento do pigmento após a secagem. B) Extratos diluídos em DMSO e prontos para a realização dos testes biológicos.

O primeiro ensaio realizado foi o de citotoxicidade, para avaliar a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774.A1, através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), um método colorimétrico que se baseia na avaliação da atividade metabólica dos macrófagos. Essa atividade é expressa através da redução do metabolismo do MTT, realizada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. A ação da enzima resulta na formação de cristais de formazan, estes cristais são insolúveis em água e uma de suas características é possuir a coloração arroxeada, que pode ser quantificada por

leitura da absorbância em um comprimento de onda de 550nm em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

Nessa primeira etapa foram testados os cinco extratos de leveduras e o fármaco padrão, anfotericina, nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos e 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM para o fármaco padrão, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 3. Até a máxima concentração testada, que foi de 100 $\mu\text{g/mL}$, não foi possível calcular a concentração inibitória de 50% (CI_{50}), que é a concentração capaz de inibir 50% das células, pois o efeito citotóxico máximo dos extratos 19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19, foi de $40,54 \pm 3,37\%$; $24,37 \pm 3,66\%$; $29,09 \pm 3,57\%$; NA; $22,98 \pm 1,63\%$, respectivamente. A anfotericina B, fármaco padrão utilizado, demonstrou CI_{50} de $7,68\mu\text{M}$ e efeito citotóxico máximo de $88,98 \pm 1,66\%$. Os resultados foram comparados ao DMSO (0,1% e 0,2%), o veículo utilizado para solubilizar os extratos, e que não possui citotoxicidade significativa para as células hospedeiras.

Tabela 3 - Efeito dos extratos de leveduras e da anfotericina B no ensaio de viabilidade celular sobre macrófagos após 48 horas.

TRATAMENTO	CI_{50} ^a	EFEITO MÁXIMO \pm D.P. (%) ^b
Anfotericina B	7,68 μM	$88,98 \pm 1,66^{***}$
19L15	>100 $\mu\text{g/mL}$	$40,54 \pm 3,37^{***}$
4L2	>100 $\mu\text{g/mL}$	$24,37 \pm 3,66^{***}$
2L19	>100 $\mu\text{g/mL}$	$29,09 \pm 3,57^{***}$
NL1	>100 $\mu\text{g/mL}$	NA
GL19	>100 $\mu\text{g/mL}$	$22,98 \pm 1,63^{***}$

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^b Média \pm desvio padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Após a investigação dos possíveis efeitos citotóxicos para a célula hospedeira, onde os extratos não apresentaram efeito tóxico máximo acima de 50%, foi possível dar continuidade e realizar o ensaio para avaliar o efeito leishmanicida dos extratos frente a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Tabelas 4 e 5), como um *screening*. Os extratos de leveduras

testados não apresentaram letalidade para os parasitos até a máxima concentração testada, que foi 100 µg/mL, não sendo possível também calcular a CI₅₀ deles. A anfotericina B, em sua máxima concentração testada, atingiu efeito máximo de 100% e CI₅₀ de 0,005 e 0,02 µM, em *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Tabela 4 - Efeito leishmanicida dos extratos de leveduras antárticas e anfotericina B frente promastigotas de *L. amazonensis*.

TRATAMENTO	CI ₅₀ ^a	EFEITO MÁXIMO ± D.P. (%) ^b
Anfotericina B	0,005 µM	100 ± 0*
19L15	>100 µg/mL	NA
4L2	>100 µg/mL	NA
2L19	>100 µg/mL	NA
NL1	>100 µg/mL	NA
GL19	>100 µg/mL	NA

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta. ^b Média ± desvio padrão do efeito máximo em triplicatas de um experimento representativo. NA: tratamento não apresenta atividade leishmanicida significativa em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001.

Tabela 5 - Efeito leishmanicida dos extratos de leveduras antárticas e Anfotericina B frente promastigotas de *L. chagasi*.

TRATAMENTO	CI ₅₀ ^a	EFEITO MÁXIMO ± D.P. (%) ^b
Anfotericina B	0,02 µM	100 ± 0***
19L15	>100 µg/mL	NA
4L2	>100 µg/mL	NA
2L19	>100 µg/mL	NA
NL1	>100 µg/mL	NA
GL19	>100 µg/mL	NA

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta. ^b Média ± desvio padrão do efeito máximo em triplicatas de um experimento representativo. NA: tratamento não apresenta atividade leishmanicida significativa em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001.

Em seguida foi realizado o teste de citotoxicidade frente aos macrófagos, dos extratos pigmentados de fungos filamentosos: 4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetato, 2FFLQ6 acetona, 1EMP1, 3EMP4, 2EMP4 e o fármaco padrão, anfotericina B, nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos e 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM para o fármaco padrão (Tabela 6). Foi possível calcular a CI_{50} dos extratos 4FFLQ2 e 5YP4, que foi de $21,79 \pm 0,96 \mu\text{g/mL}$ e $63,09 \pm 3,34 \mu\text{g/mL}$, com citotoxicidade máxima de $60,53 \pm 2,50\%$ e $67,33 \pm 1,51\%$, respectivamente. Até a máxima concentração testada (100 $\mu\text{g/mL}$), os outros extratos não apresentaram citotoxicidade máxima acima de 50%, sendo $19,68 \pm 6,62\%$ e $23,38 \pm 7,16\%$. A anfotericina B apresentou uma CI_{50} de $35,88 \pm 5,60 \mu\text{M}$ e efeito citotóxico máximo de $80,99 \pm 2,08\%$. Os resultados foram comparados ao DMSO 0,1%, o veículo utilizado para solubilizar os extratos, e que não possui citotoxicidade significativa para as células hospedeiras.

Tabela 6 - Efeito dos extratos de fungos filamentosos e da anfotericina B no ensaio de viabilidade celular sobre macrófagos J774.A1 após 48 horas.

TRATAMENTO	$\text{CI}_{50}^a \pm \text{SEM}$	EFEITO MÁXIMO $\pm \text{SEM}$ (%) ^b
Anfotericina B	$35,88 \pm 5,60 \mu\text{M}$	$80,99 \pm 2,08^{***}$
4FFLQ2	$21,79 \pm 0,96 \mu\text{g/mL}$	$60,53 \pm 2,50^{***}$
5YP4	$63,09 \pm 3,34 \mu\text{g/mL}$	$67,33 \pm 1,51^{***}$
2FFLQ6 acetato	$>100 \mu\text{g/mL}$	$19,68 \pm 6,62^*$
2FFLQ6 acetona	$>100 \mu\text{g/mL}$	$23,38 \pm 7,16^{***}$
1EMP1	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA
3EMP4	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA
2EMP4	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^b Média \pm desvio padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Dando continuidade aos experimentos, foi possível avaliar a atividade leishmanicida dos extratos de fungos filamentosos frente as formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Tabela 7 e 8). Quando testados contra a espécie de *L. chagasi*, os extratos não

conseguiram matar 50% dos parasitos, não sendo possível então calcular a CI_{50} . Os extratos 4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetato apresentaram efeito máximo de $35,61 \pm 1,70\%$; $40,59 \pm 7,69\%$ e $43,59 \pm 9,21\%$, respectivamente. A anfotericina B apresentou CI_{50} $0,48 \pm 0,44 \mu\text{M}$ e efeito máximo de $61,29 \pm 30,66\%$.

Quando testados contra a espécie de *L. amazonensis*, os extratos 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona apresentaram CI_{50} de $35,35 \pm 4,52 \mu\text{g/mL}$ e $30,61 \pm 5,46 \mu\text{g/mL}$, e efeito máximo de $74,36 \pm 4,10\%$ e $84,62 \pm 5,32\%$. Nos demais extratos não foi possível calcular a CI_{50} , pois o efeito máximo foi abaixo de 50%. A anfotericina B apresentou CI_{50} de $1,22 \pm 0,08 \mu\text{M}$ e efeito máximo de $92,81 \pm 1,90\%$.

Tabela 7 - Efeito leishmanicida dos extratos de fungos filamentosos da Antártica e Anfotericina B frente promastigotas de *L. chagasi*.

TRATAMENTO	$CI_{50}^a \pm \text{SEM}$	EFEITO MÁXIMO $\pm \text{SEM}$ (%) ^b
Anfotericina B	$0,48 \pm 0,44 \mu\text{M}$	$61,29 \pm 30,66^{***}$
4FFLQ2	$>100 \mu\text{g/mL}$	$35,61 \pm 1,70^{***}$
5YP4	$>100 \mu\text{g/mL}$	$40,59 \pm 7,69^{***}$
2FFLQ6 acetato	$>100 \mu\text{g/mL}$	$43,59 \pm 9,21^{***}$
2FFLQ6 acetona	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA
1EMP1	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA
3EMP4	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA
2EMP4	$>100 \mu\text{g/mL}$	NA

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta. ^b Média \pm desvio padrão do efeito máximo em triplicatas de um experimento representativo. NA: tratamento não apresenta atividade leishmanicida significativa em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Tabela 8 - Efeito leishmanicida dos extratos de fungos filamentosos da Antártica e anfotericina B frente promastigotas de *L. amazonensis*.

TRATAMENTO	$CI_{50}^a \pm \text{SEM}$	EFEITO MÁXIMO $\pm \text{SEM}$ (%) ^b
Anfotericina B	$1,22 \pm 0,08 \mu\text{M}$	$92,81 \pm 1,90^{***}$

4FFLQ2	>100 µg/mL	NA
5YP4	>100 µg/mL	39,61 ± 8,24***
2FFLQ6 acetato	35,35 ± 4,52 µg/mL	74,36 ± 4,10***
2FFLQ6 acetona	30,61 ± 5,46 µg/mL	84,62 ± 5,32***
1EMP1	>100 µg/mL	43,58 ± 4,47***
3EMP4	>100 µg/mL	NA
2EMP4	>100 µg/mL	NA

Legenda: ^a Concentração Inibitória de 50 % (CI50) calculada através de curvas concentração-resposta. ^b Média ± desvio padrão do efeito máximo em triplicatas de um experimento representativo. NA: tratamento não apresenta atividade leishmanicida significativa em relação ao grupo DMSO. Os valores foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Microrganismos que vivem ambientes frios, são adaptados para prosperarem sob essas circunstâncias e tem contribuições para reciclagem de nutrientes e mineralização da matéria orgânica, através de enzimas. As enzimas adaptadas ao frio incluem amilase, celulase, invertase, protease, lipase e isomerase, que são usadas nas indústrias de alimentos, biocombustíveis e detergentes. Um dos motivos desses microrganismos adaptados ao frio serem cada vez mais estudados, é seu potencial em aplicações biotecnológicas (CARRASCO et al., 2012).

No trabalho publicado por Carrasco e colaboradores (2012), ele descreve o isolamento de algumas leveduras oriundas da Ilha Rei George, a principal ilha do arquipélago de Shetland Sul – Antártica, que foram caracterizadas fisiologicamente e identificadas em nível molecular. A maioria dos isolados apresentaram de 2 a 4 atividades enzimáticas, exceto dois isolados que apresentaram 6, onde um dele é do gênero *Dioszegia*, que foi uma das leveduras testadas no presente trabalho.

Fungos, bactérias e leveduras são capazes de produzir pigmentos, e os que foram extraídos das biomassas de leveduras eram das cores laranja, laranja-rosado e amarelo, onde os de pigmento amarelo não foi possível a identificação de gênero e espécie até o momento. A presença dessas cores já era esperada, pois sabe-se que espécies do gênero *Dioszegia* dão origem a colônias visivelmente de cor laranja (CONNELL et al., 2010).

Fungos de forma geral, são produtores de uma variedade de pigmentos, como os carotenoides (RAO et al., 2017), que são responsáveis pelas cores alaranjadas e compreendem um considerável número de compostos, sendo grande parte deles com atividades biológicas como: efeito antioxidante, inibição da proliferação celular, aumento da resposta imunológica, regressão de lesões malignas e inibição da mutagênese (VOLP et al., 2011; MILANI et al., 2017).

As espécies *Candida davisiana*, *Dioszegia* sp e *Cystobasidium alpinum* geraram metabólitos secundários que além de já possuírem registros de algumas atividades biológicas, como enzimáticas, apresentam também essas características de pigmentos e por isso também se acreditou em uma possível atividade antiparasitária, além de uma baixa toxicidade para as células hospedeira da *Leishmania*, que foi o que aconteceu, já que até a concentração máxima de 100 µg/mL não foi possível identificar um efeito deletério de 50% dos macrófagos. Visto que a não citotoxicidade ou a baixa citotoxicidade é fundamental na seleção de protótipos a fármacos. Os resultados são tidos como sinal positivo para a continuidade das pesquisas.

Quanto a atividade frente aos parasitos, há estudos que mostram essa inibição e que serviram de estímulo para a atual pesquisa, como é o caso de Ogaki e colaboradores (2020) que publicaram um estudo sobre a atividade de extratos fúngicos antárticos contra promastigotas de *L. amazonensis*, onde os isolados *Pezizomycotina* sp. UFMGCB 13963 e *Mortierella* sp. 1 UFMGCB 13012 apresentaram atividade leishmanicida moderada de 61,7% e 63,2% de inibição, respectivamente.

Na mesma linha de investigação de fungos originados da Antártica, De Menezes et al (2020) apresentaram um estudo a respeito da atividade biológica de extratos obtidos de culturas de espécies de *Penicillium* como herbicidas e antiparasitários. O ensaio leishmanicida foi realizado com promastigotas de *L. amazonensis*, e as espécies que demonstraram maior atividade foram a *Penicillium* sp. 2, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium* sp. 1, com inibição de 59±1%, 55±5% e 53±5% respectivamente.

No trabalho de Gonçalves et al., (2015) eles testaram uma diversidade de espécies fúngicas isoladas de diferentes locais da Antártica em promastigotas de *L. amazonensis*, mas nenhuma conseguiu inibir o mínimo de 50% dos parasitos, que foi o que também ocorreu no

presente estudo, com as espécies de leveduras testadas, estas que foram testadas pela primeira vez neste trabalho. Porém, é válido dar continuidade aos experimentos com os extratos de fungos filamentosos que já foram produzidos, já que são outras espécies e possuem outras características, como a pigmentação, diferentes das leveduras, a fim de descobrir uma possível atividade leishmanicida.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que os extratos de leveduras 19L15, 4L2, 2L19, NL1 e GL19 quando testados para avaliar sua citotoxicidade à célula hospedeira, mostraram que possuem toxicidade inferior ao fármaco padrão utilizado, a anfotericina B. Quando foram testados para avaliar a atividade leishmanicida, não demonstraram ser ativos contra as espécies do parasito testadas. Os extratos de fungos filamentosos 4FFLQ2, 5YP4, 2FFLQ6 acetato, 2FFLQ6 acetona, 1EMP1, 3EMP4, 2EMP4 não apresentaram atividade leishmanicida frente as formas promastigotas de *L. chagasi*. Mas, quando testados contra a espécie de *L. amazonensis*, os extratos 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona demonstraram CI_{50} de $35,35 \mu\text{g/mL} \pm 4,52$ e $30,61 \pm 5,46 \mu\text{g/mL}$, com efeito máximo de $74,36 \pm 4,10\%$ e $84,62 \pm 5,32\%$, respectivamente. Esses extratos, com possível atividade leishmanicida contra *L. amazonensis*, não apresentaram citotoxicidade frente as células hospedeiras. Desta forma, se faz necessário mais estudos e mais testes a respeito da atividade leishmanicida desses extratos derivados do continente antártico.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

BRANCO SANTOS, Joice Castelo et al. Moléculas à base de bisfosfonatos como potenciais novas drogas antiparasitárias. **Moléculas**, v. 25, n. 11, pág. 2602, 2020.

CARRASCO, Mario et al. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. **BMC microbiology**, v. 12, p. 1-9, 2012.

CONNELL, Laurie B. et al. *Dioszegia antarctica* sp. nov. and *Dioszegia cryoxerica* sp. nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1466-1472, 2010.

CONRADO, Rafael et al. Visão geral dos metabólitos secundários fúngicos bioativos: compostos citotóxicos e antimicrobianos. **Antibióticos**, v. 11, n. 11, pág. 1604, 2022.

DANILOVICH, Mariana Elizabeth et al. Bioprospecção antártica: em busca de microrganismos produtores de novos antimicrobianos e enzimas. **Biologia Polar**, v. 41, n. 7, pág. 1417-1433, 2018.

DE MENEZES, Graciéle Cunha Alves et al. Fungos no gelo glacial da Antártica: diversidade, distribuição e bioprospecção de compostos bioativos. **Extremófilos**. v. 24, p. 367-376, 2020.

DE MENEZES, Graciéle Cunha Alves et al. Taxonomia, diversidade, ecologia, caracterização de resistência a antifúngicos e bioprospecção de fungos presentes na neve e gelo glacial da Antártica. 2019.

GONÇALVES, Vivian N. et al. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, Vol. 38, n. 8, pp 1143-1152, 2015.

LIBKIND, Diego; VAN BROOCK, María. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 687-692, 2006.

MAYARA B. Ogaki, Daniela R. Teixeira, Rosemary Vieira, Juan M. Lírio, João P.S. Felizardo, Rodrigo C. Abuchacra, Renan P. Cardoso, Carlos L. Zani, Tânia M.A. Alves, Policarpo A.S. Junior, Silvane M.F. Murta, Emerson C. Barbosa, Jaquelline G. Oliveira, Isabela P. Ceravolo, Patrícia O. Pereira, Carlos A. Rosa, Luiz H. Rosa. Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biology**, volume 124, Issue 6, 2020, Pages 601-611.

MILANI, Alireza et al. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in Microbiology**. v.8, a. 1113, 2017

ROSA, Luiz Henrique et al. Fungos na Antártica: diversidade, ecologia, efeitos das mudanças climáticas e bioprospecção de compostos bioativos. **Fungos da Antártida: diversidade, ecologia e aplicações biotecnológicas**, p. 1-17, 2019.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro; RENHE, Isis Rodrigues Toledo; STRINGUETA, Paulo César. Carotenoides: pigmentos naturais como compostos bioativos. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 26, n. 4, p. 291-8, 2011.

5 PRODUTO 2

FUNGOS E SEUS BIOPRODUTOS A SERVIÇO DA BIOTECNOLOGIA PARA LEISHMANIOSE: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Hilda Caroline do Nascimento Santos^{a,c}, Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira^{b,c}, Andressa Letícia Lopes da Silva^{a,c}, Camilla Amanda de Oliveira Gomes^{a,c}, Cledna Kaline dos Santos Duarte^e, Aline Cavalcanti de Queiroz^{a,c,d}, Alysson Wagner Fernandes Duarte^d, Luiz Henrique Rosa^e, Magna Suzana Alexandre Moreira^{a,c,d}.

Afiliação:

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Neurociência Translacional, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^cLaboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

^dLaboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Complexo de Ciências Médicas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brasil.

^eInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

* **Autor correspondente:** Aline Cavalcanti de Queiroz

Email: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Endereço: Laboratório de Microbiologia, Imunologia, e Parasitologia, Centro de Ciências Médicas e de Enfermagem, Universidade Federal Alagoas - Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa - Bom Sucesso, Arapiraca - AL, 57309-005, Brasil.

Destaques:

- O registro de patentes de metabólitos fúngicos ainda é escasso.
- Foram encontrados testes com as espécies *L. amazonensis*, *L. major*, and *L. donovani*.
- Camundongos BALB/c são o principal modelo animal.

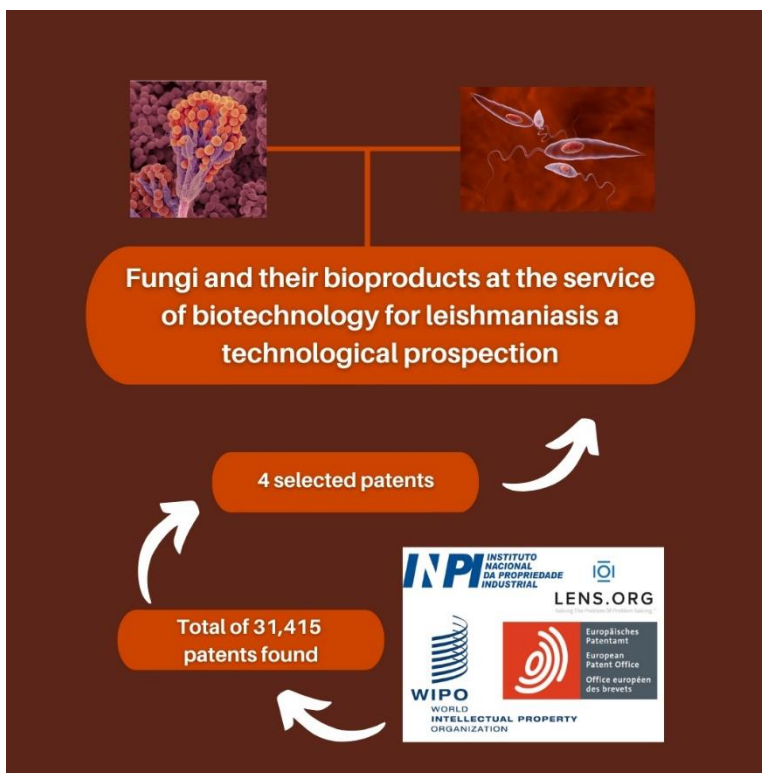
RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, de transmissão vetorial e distribuída em países de todos os continentes. Apesar da sua importância epidemiológica e da complexidade da doença, o tratamento farmacológico atual é limitado, causando diversos efeitos adversos. Diante de tal contexto, é urgente a busca por novas substâncias ativas contra o parasito *Leishmania* e metabólitos de origem microbiana, como aqueles produzidos por fungos podem ser estrategicamente relevantes na busca por novas substâncias com atividade leishmanicida. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi prospectar o desenvolvimento de produtos e processos relacionados à produção de metabólitos produzidos por fungos com atividade contra leishmaniose. A busca das patentes foi realizada nas bases de dados: INPI, WIPO, The Lens e EPO. Os critérios de inclusão foram documentos de patentes que apontassem relação entre metabólitos produzidos por fungos e atividade leishmanicida, nos últimos dez anos. Os critérios de exclusão foram patentes que não tinham essa temática e patentes repetidas. De

31.415 patentes avaliadas, apenas 4 patentes foram selecionadas, onde estas demonstraram atividade contra as espécies de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, além de uma baixa toxicidade. Foi observado uma distribuição espaçada entre os anos de publicação das patentes e quatro países detentores dessas publicações. Apesar de se ter resultados de prospecção biotecnológica sobre o uso de metabólitos de fungos com atividade contra o parasito *Leishmania spp.*, o assunto ainda é pouco abordado pela comunidade científica.

Palavras-chave: *Leishmania*, Microrganismos, Tecnologia, Patentes.

Resumo Gráfico:



1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença crônica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, transmitida através do repasto sanguíneo de inseto vetor denominados “flebotomíneo”. O parasito durante seu ciclo evolutivo apresenta duas formas evolutivas, com promastigotas e amastigotas, sendo as últimas de caráter intracelular obrigatório. A literatura mostra que há 350 milhões de pessoas em risco de infecção e uma estimativa de 1.6 milhões de novos casos ao ano (ABADÍAS-GRANADO et al., 2021; GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2015).

As manifestações clínicas da leishmaniose são divididas em leishmaniose tegumentar e visceral. A forma tegumentar acomete pele e regiões mucosas e a visceral é a forma mais grave da doença que acomete órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (ANVERSA et al., 2018; ZACARIAS et al, 2017). Em dissonância com a relevância epidemiológica e importância clínica dessa doença, os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento são bastante limitados, especialmente pelas diversas reações adversas muito características. Os principais fármacos utilizados para o tratamento são os antimoniais pentavalentes (como o estibogluconato de sódio e o N-methyl glucamine), a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paramomicina. Entretanto, durante a terapêutica farmacológica os pacientes acabam manifestando efeitos colaterais como toxicidade cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético, além de que os fármacos disponíveis no mercado na atualidade são desvantajosos para o combate à parasitose (ROATT et al, 2020; GHORBANI; FARHOUDI, 2018; NEVES et al, 2011).

Diante dessa problemática, uma alternativa estratégica tem sido a busca de novas moléculas ativas com menor efeito citotóxico e que sejam mais acessíveis para o tratamento da leishmaniose. E compostos bioativos produzidos por fungos podem ser importantes na busca protótipos com atividade leishmanicida como reportado em revisão sistemática recente de Varjão et al. (2021), com ênfase nos gêneros *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Os metabólitos secundários fúngicos são produzidos a partir de vias metabólicas que apresentam aplicações como proteção contra danos UV, proteção contra produtos naturais tóxicos e descoberta de novas drogas com atividade leishmanicida (KELLER, 2019).

Por outro lado, estudos de revisão patentária têm sido uma abordagem recente na compreensão do cenário das inovações tecnológicas desenvolvidas no estudo de protótipos de

fármacos relacionados à diferentes doenças parasitárias negligenciadas, tais como esquistossomose (ADEKYIA et al. 2021), doença de Chagas, (FLORES-QUIROZ et al. 2022; IMRAN et al. 2022) e leishmaniose (RAMA et al. 2015; CARVALHO et al., 2020; SILVA et al. 2022), além de novos métodos de imunodiagnóstico da leishmaniose ALBUQUERQUE et al. 2023). Vale destacar que não há estudo de prospecção tecnológica com metabólitos produzidos por fungos e que tenha aplicação como fármaco leishmanicida, embora a literatura científica reporte diferentes metabólitos fúngicos promissores nesse contexto, o que assim reforça a importância dessa pesquisa.

Como compostos bioativos derivados de fungos tem sido fontes de novos fármacos na literatura recente (VARJÃO et al. 2022), estudos de prospecção tecnológica, os quais se propõe a avaliar o cenário patentário referente a temática, podem ser estrategicamente importantes na descoberta de produtos e/ou processos de desenvolvimento de protótipos de fármacos relacionados a esta doença negligenciada, já que há estudos da literatura reportam atividade biológica de diferentes produtos fúngicos. Desse modo, o objetivo dessa revisão foi prospectar o desenvolvimento de produtos e processos relacionados à metabólitos produzidos por fungos com atividade contra *Leishmania*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido a partir da busca de documentos de patentes que descrevia a utilização de metabólitos fúngicos contra o parasito *Leishmania* spp. Para isso, as buscas foram realizadas entre os meses de junho e julho de 2022, utilizando as seguintes bases de dados: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (<https://www.gov.br/inpi/pt-br>) World Intellectual Organização de Propriedade (WIPO) (<https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf>), The Lens (<https://www.lens.org/>) e European Patent Office (EPO) (<https://www.epo.org/>). Inicialmente, foi incluída a base de dados Google Patentes, mas devido ao seu grande número de patentes e ao fato de que muitas não se enquadravam no escopo da pesquisa, essa foi excluída como base de dados para esse trabalho.

A pesquisa das patentes foi realizada de acordo com quatro combinações de palavras chaves (Tabela 1). Como critérios de inclusão, foram pesquisadas: patentes dos últimos 10 anos (2012-2022) e que descreviam o uso de metabólitos fúngicos contra leishmaniose. Os

critérios de exclusão foram patentes que não se enquadram na temática de uso de metabólitos fúngicos.

Tabela 1. Descritores utilizados na busca dos documentos de patentes.

Palavra-chave	Operador booleano	Palavra-chave
secondary metabolites fungi	AND	Leishmaniasis
secondary metabolites fungi	AND	<i>Leishmania</i>
fungi metabolites	AND	Leishmaniasis
fungi metabolites	AND	<i>Leishmania</i>

Após a busca nas bases de dados, aquelas patentes repetidas foram excluídas e as selecionadas para o estudo foram analisadas de acordo com a distribuição temporal, geográfica e suas características (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma de pesquisa e triagem de documentos de patentes



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantitativo de patentes

Inicialmente, foi realizada a busca nas 4 bases de dados com os descritores selecionados, sendo encontradas um total de 31.415 patentes (Tabela 2). Essas foram analisadas com base no título e resumos. Ao final, um total de 4 patentes foram selecionadas para a construção da presente revisão.

Tabela 2. Total de patentes encontradas nas bases de dados de acordo com o período de 2012 a 2022

Palavra-chave	INPI	WIPO	THE LENS	EPO	Total por combinação
secondary metabolites fungi AND Leishmaniasis	209	0	5.662	931	6.802
secondary metabolites fungi AND Leishmania	24	3.771	1.614	578	5.987
fungi metabolites AND Leishmaniasis	11	4.313	1.968	693	6.985
fungi metabolites AND Leishmania	0	7.075	3.473	1.093	11.641
Total por base	244	15.159	12.717	3.295	31.415

3.2 Patentes selecionadas de acordo com os critérios de elegibilidade

Ao realizar a pesquisa nas bases de dados, foi observado que a temática proposta para essa revisão é pouco explorada. É possível relatar uma grande escassez de patentes que abordam o uso de metabólitos de fungos como um possível tratamento para a leishmaniose. Foram selecionados 4 documentos de patentes para a construção do trabalho, que é descrita na tabela 3.

Tabela 3. Seleção de patentes de acordo com os critérios de elegibilidade

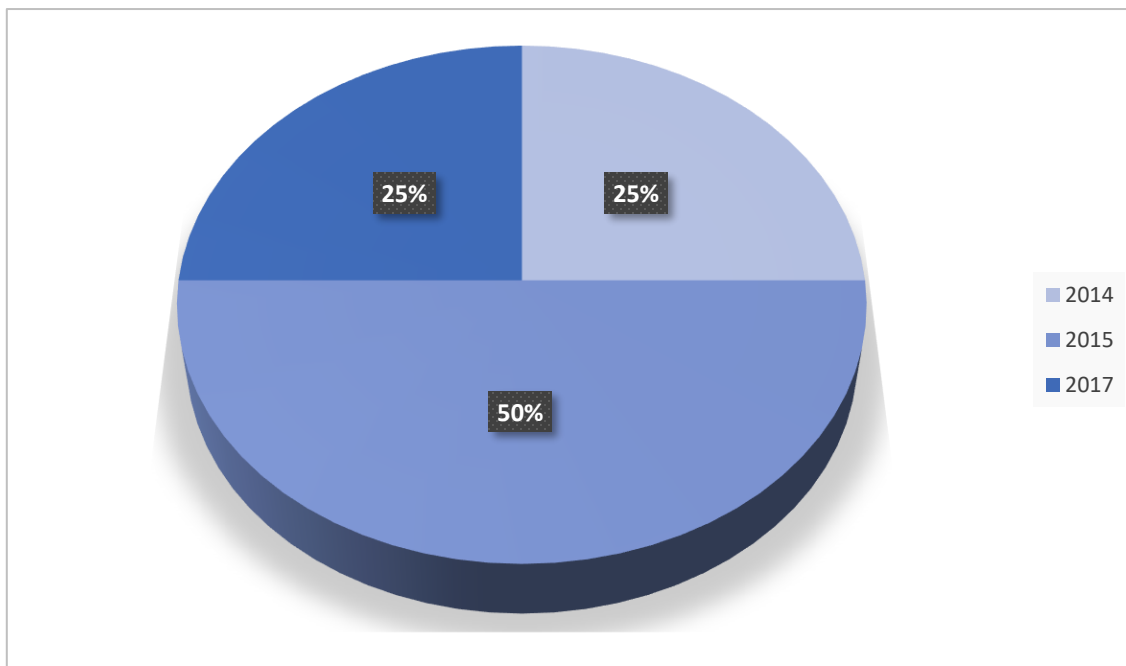
Número do documento	Título	Código IPC	País de origem	Autores e ano de publicação
EP 2 735 339 A1	Extract and isolated compounds from <i>Drechslera rostrata</i> and/or <i>Eurotium tonophilum</i> for use as anti-leishmania-major agents	A61P 33/02 A61K 36/06 A61K 36/062	Arábia Saudita	ALQASOMY et al. (2014)
US 9115106 B2	Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-y-pyrone (HMP) as a leishmanicidal agente	A01N43/16 A61K31/35 A61K31/351 A61K31/366 C07D309/40 C07D315/00	Brasil	SANTOS et al. (2015)
US2017050946A1	Antimicrobials from an epigenetics based fungal metabolite screening program	C07D311/58 C12P17/06	Estados Unidos	DEMERS AND BAKER (2017)
WO 2015/059095 A1	Antimicrobial polypeptide from the fungus <i>coprinopsis cinerea</i>	C07G 11/00	Suíça	AEBI et al. (2015)

3.3 Distribuição temporal das patentes selecionadas

Nos anos de 2012 e 2013 não houve publicação de patentes com a temática proposta. Em 2014 foi publicado um documento de patente e em 2015 o número subiu de uma para duas publicações. No ano seguinte não foram encontradas publicações. Já em 2017 houve uma publicação (Figura 2).

Com relação a distribuição temporal é possível observar que não há uma linearidade entre os anos e poucas patentes foram publicadas nos últimos 10 anos. Assim, com base nos achados, é necessário incentivar a pesquisa sobre metabólitos fúngicos e seu uso no combate à leishmaniose.

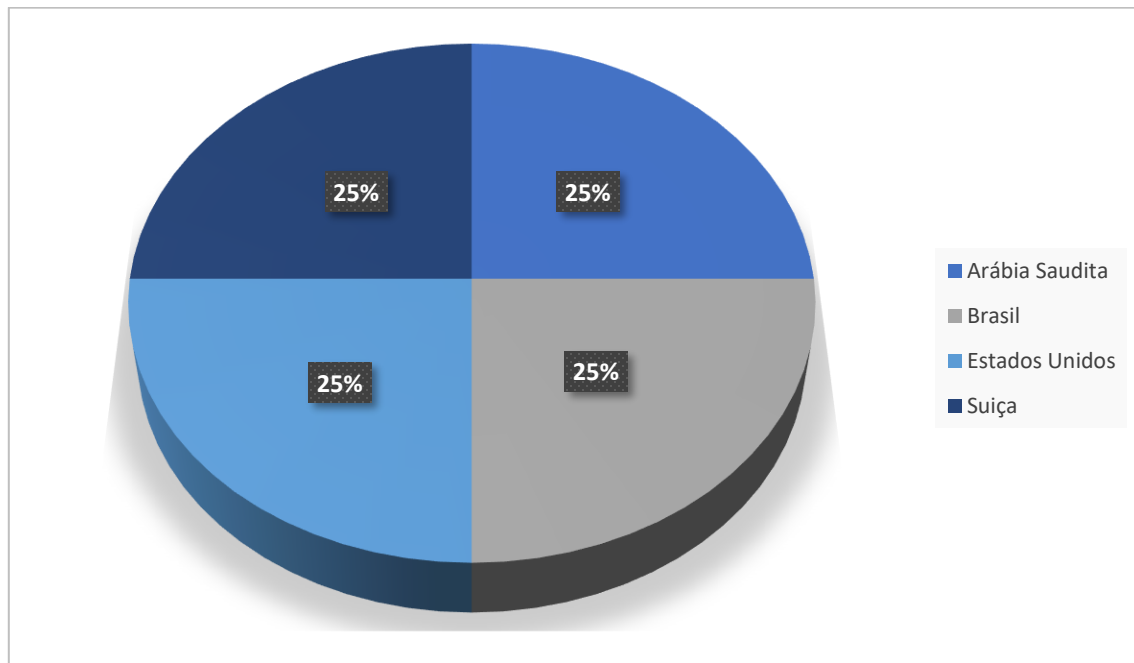
Figura 2. Distribuição temporal das patentes publicadas nos últimos 10 anos.



3.4 Análise da distribuição geográfica dos documentos de patentes selecionadas

Quando analisada a distribuição geográfica, os países depositantes foram: Arábia Saudita, Brasil, Estados Unidos e Suíça (Figura 3). O Brasil foi um dos países que estava entre os que publicaram sobre a temática de utilização de extratos fúngicos no tratamento da leishmaniose. Esse fato pode ser explicado pelo motivo do Brasil ser um país endêmico para a leishmaniose. Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde, 90% dos casos no mundo concentra-se no Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul (OPAS, 2019). Devido a importância epidemiológica da leishmaniose para o país, há incentivo para buscar novas alternativas de tratamento. Além disso, Estados Unidos, Suíça e Arábia Saudita publicaram um documento de patente.

Figura 3. Distribuição geográfica das patentes selecionadas



3.5 Análise dos códigos de classificação internacional de patentes (IPC)

O IPC é uma classificação internacional caracterizada a partir do acordo de Estrasburgo, utilizado para classificar patentes de invenções com base nas áreas técnicas em que elas se enquadram. O sistema é mantido pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) e é utilizado em todo o mundo para facilitar a busca e a análise de patentes. O código IPC é composto por uma série de letras e números que representam a área técnica da patente, bem como o tipo de invenção e outras características relevantes. Áreas tecnológicas são divididas nas classes de A a H, com aproximadamente 75.000 subdivisões (WIPO, 2022). A subclasse com mais citações nas patentes selecionadas foram A61K (5 citações) e C07D (3 citações) que correspondem, respectivamente, a preparações para uso médico, odontológico ou higiênicos e componentes heterocíclicos. Além dessas subclasses, foram encontradas também A61P, A01N, C12P E C07G (Tabela 4).

Tabela 4. Subclasses da IPC das patentes selecionadas, seu número de citações e descrição.

Subclasses IPC	Número de citações	Descrição
A61K	5	Preparações para fins médicos, odontológicos ou higiênicos
C0D7	3	Compostos heterocíclicos
61P	1	Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais
A01N	1	Conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos; biocidas; repelentes ou atrativos de pestes; reguladores do crescimento de plantas
C12P	1	Processos de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica
C07G	1	Compostos de constituição desconhecida

3.6 Avaliação dos metabólitos fúngicos aplicados contra o parasito *Leishmania spp.*

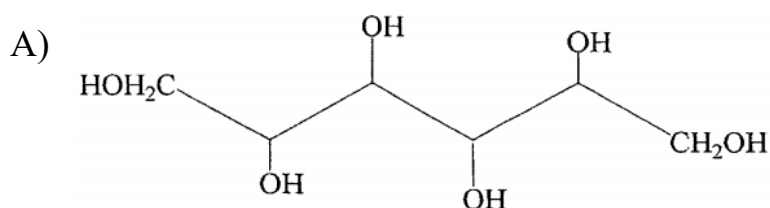
Metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura durante o crescimento de organismos vivos, e fungos filamentosos sintetizam uma quantidade desses metabólitos cerca de 73% a mais que outros microrganismos. O primeiro metabólito fúngico eficaz foi a penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, e atualmente os fungos estão cada vez mais envolvidos no processamento industrial (SPECIAN et al, 2014).

De maneira geral, as patentes incluídas nesta revisão buscaram encontrar novas fontes que pudessem originar fármacos com potencial leishmanicida. A patente de número EP 2 735

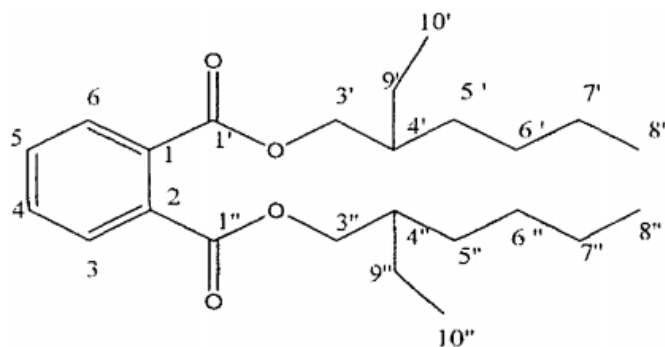
339 A1, publicada em 2014, teve como objetivo produzir extratos fúngicos das espécies *Drechslera rostrata* e *Eurotium tonophilum* (que foram obtidas da Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas de Células) para uso como agente anti-leishmania. A partir da produção dos extratos, foram isolados três compostos denominados Hexane-1,2,3,4,5,6-hexol (H1), Diisooctylphthalate (H2) e 1,8-Dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthraquinone (H3) (Figura 4). Os ensaios biológicos foram tanto *in vitro* como *in vivo*. A atividade leishmanicida dos extratos etanólicos de ambos os fungos foi realizada contra *L. major*. Os extratos apresentaram atividade contra o parasito, com CI_{50} de 28.8 e 28.2 $\mu\text{g/mL}$ para *Drechslera rostrata* e *Eurotium tonophilum*, respectivamente. Já os compostos isolados H1, H2 e H3 apresentaram IC_{50} de, nesta ordem, 6.5, 3.2 e 19.38 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio *in vivo* com camundongos infectados, os extratos etanólicos dos dois fungos apresentaram atividade contra *Leishmania major*. Após um período de 10 dias, os camundongos (*Balb/c*, 45-50 g) apresentaram-se curados.

Além dos ensaios citados acima, foram observadas toxicidade aguda e teste de dose letal mediana (LD_{50}) e toxicidade subcrônica. Quanto à toxicidade aguda, os animais que receberam os três extratos testados em doses de até 5.000 mg kg^{-1} sobreviveram além das 24 horas de observação. Ademais, não apresentaram alterações nos olhos, fezes e urina. Os extratos também não induziram efeitos deletérios nas funções do fígado e nos rins após 4 semanas de administração oral.

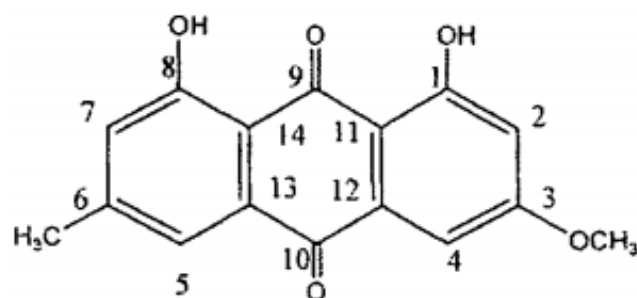
Figura 4. Estruturas químicas de compostos com atividade leishmanicida. A) Hexane-1,2,3,4,5,6-hexol (H1). B) Diisooctylphthalate (H2). C) 1,8-Dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthraquinone (H3).



B)



C)



Santos et al. (2015) demonstrou no documento de patente, número US 9115106 B2, o uso de 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone (HMP), metabólito secundário produzido por *Aspergillus* sp, como agente leishmanicida. O HMP foi obtido a partir de esporos do fungo e testados contra *L. amazonensis*. Os resultados obtidos foram promissores, observou-se que o HMP induz a ativação das células, causando um aumento na polimerização e espalhamento do filamento de actina, em comparação com as células controle. Além disso, o 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone induz uma maior produção de superóxido nas células infectadas com *L. amazonensis* durante o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$. Outro efeito importante é que o HMP tem capacidade de inibir cerca de 68% de promastigotas de *Leishmania* e uma redução de 79% em amastigotas durante a infecção *in vitro*, quando tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$. Assim, o HMP pode ser considerado metabólito promissor no combate a uma das espécies causadoras da leishmaniose cutânea. Já a patente de número US2017050946A1 também relata o uso de extratos fúngicos com atividade leishmanicida contra a espécie *L. donovani*.

O documento de patente de número WO 2015/059095A1, publicado por AEBI e colaboradores (2015), teve como objetivo de fornecer novos polipeptídeos funcionais, em novos antibióticos específicos, do fungo *Coprinopsis cinerea*, que podem ser usados no

combate ao parasito *Leishmania* e também outros microrganismos. Para o uso terapêutico desses polipeptídeos podem ser administrados em qualquer forma, no entanto para infecções com as espécies causadoras da leishmaniose é recomendado o uso da via parenteral.

Na pesquisa por novos tratamentos para leishmaniose, as fontes que tem sido mais encontradas são a partir de algas, bactérias e fungos. Pouco se tem falando na literatura sobre a atividade das espécies *D. rostrata* e *E. tonophilum* frente a leishmaniose, sendo mais comum seus testes antitumorais (ALASMARY et al, 2018). O que é registrado (inclusive na própria patente) são extratos de outros fungos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Davidiella*, *Helgardia*, *Herpotrichia*, *Microdochium*, *Oculimacula* e *Phaeosphaeria*, que já apresentaram atividade antileishmanicida (ALQASOMY et al, 2014).

O HMP é um metabólito secundário que inicialmente foi utilizado com dietético, antioxidante, corante e posteriormente como conservante. Atualmente é utilizado em cosméticos e como anti-inflamatórios, por isso houve o interesse em direcioná-lo para outros testes biológicos. Apesar da patente ter sido o primeiro estudo publicado a respeito da atividade leishmanicida (SANTOS et al, 2015), já era de conhecimento, através do trabalho publicado por Burdock e colaboradores (2001), que não apresentava toxicidade para o ser humano e que ele possui uma rota de metabolismo semelhante à hexose dietética.

Uma outra alternativa para se procurar uma possível terapia medicamentosa para a leishmaniose, é utilizando fungos como fontes para possíveis antimicrobianos, onde essa interação desempenha papel fundamental no combate a outros microrganismos (AEBI et al, 2015).

Fontes de produtos naturais também podem agir de forma sinérgica, como foi mostrado na patente de Maurya e Chandrasekaran, 2017. O estudo mostra que a combinação da miltefosina com a withaferin-A potencializa o tratamento da leishmaniose. A concentração utilizada foi de 2mg/kg de withaferin-A e 2,5 mg/kg de miltefosina, onde a carga parasitária diminuiu significativamente e não foi detectado efeito adverso (BARBOSA et al., 2020).

A ação de metabólitos secundários para o tratamento da leishmaniose, também é mostrada em outros estudos, onde esponjas marinhas da Antártica mostraram ser ricas fontes de metabólitos secundários. Diterpenos foram isolados, testados e demonstraram atividade

contra *L. donovani*, e o posicionamento dos grupos metoxil no anel furano parece ser importante para aumentar a atividade (BAKER et al., 2016).

Desta forma, se faz cada vez mais necessário o estudo sobre o ambiente Antártico como possíveis fontes de metabólitos secundários, que poderão originar no futuro novas terapias medicamentosas para o tratamento de diversas doenças, dentre elas, a leishmaniose.

4. CONCLUSÃO

Ainda é escassa a pesquisa sobre metabólitos fúngicos com atividade leishmanicida, e é evidente que as publicações da última década são espaçadas entre os anos, e não algo contínuo. Além disso, as patentes encontradas abrangem países pertencentes a diversos continentes do mundo. Mas, mesmo com as limitações, é possível observar um saldo positivo, pois as patentes selecionadas apresentam dados que mostram algum tipo de eficácia sobre o parasito, com é o caso dos extratos fúngicos de *D. rostrata* e *E. tonophilum*, que apresentaram IC₅₀ de 28.8 e 28.2 µg/mL, além dos isolados H1, H2 e H3 que apresentaram CI₅₀ de 6.5, 3.2 e 19.38 µg/mL, respectivamente. O estudo sobre 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone mostrou que o mesmo é capaz de inibir cerca de 68% de promastigotas e de 79% em amastigotas, além dos outros estudos que demonstram uma certa atividade leishmanicida e a possibilidade de fornecer novos polipeptídeos funcionais, em novos antibióticos com fontes fúngicas. Portanto, se faz necessária a continuação e o incentivo à pesquisa de bioprospecção utilizando isolados e extratos fúngicos, para que em um futuro próximo, um novo fármaco contra a leishmaniose de caráter acessível e menos tóxico seja disponibilizado para a população.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, CNPq, MCTC, FINEP e FAPEAL. Além disso, os autores gostariam de agradecer aos diversos colegas que trabalham na UFAL por suas críticas construtivas e assistência neste projeto.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. (2021). Leishmaniasis cutânea y mucocutânea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601-618, <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.05.011>.

ADEKIYA, T. A. et al. (2021). Synthesis and therapeutic delivery approaches for praziquantel: a patent review (2010-present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 31, n. 9, p. 851-865, <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1915292>.

AEBI, M. et al. (2015). Antimicrobial polypeptide from the fungus *Coprinopsis cinérea*. Assignee: ETH ZURICH. WO2015/059095A1. April 30, 2015.

ANVERSA, L. et al. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>.

ALQASOMY, S. I. R. et al. (2014). Extract and isolated compounds from *Drechslera rostrata* and/or *Eurotium tonophilum* for use as anti-*Leishmania-major* agentes. Assignee: King Saud University. EP2735339A1. May 28, 2014.

ALASMARY, F. A. S. et al. (2018) Antitumor activity of extract and isolated compounds from *Drechslera rostrata* and *Eurotium tonophilum*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 279-285, doi: [10.1016/j.jsps.2017.11.011](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.11.011).

ALBUQUERQUE, L. W. N. et al. (2023). New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological Prospecting. **Acta Tropica**, v.242, p. 106903, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106903>.

DE CARVALHO, Y. M. B. G. et al. (2020). Pharmaceutical agentes for treatment of leishmaniasis: a patente landscape. **Expert. Opin. Ther. Pat.**, v. 30, n. 8, pág. 633-641, [doi: 10.1080/13543776.2020.1789100](https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1789100).

DEMERS, D. H.; BAKER B. J. (2017). Antimicrobials from an epigenetics based fungal metabolite screening program. Assignee: University of South Florida. US2017050946A1. February 23, 2017.

BEKHIT, A. A. et al. (2018). *Leishmania* treatment and prevention: natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 229–244, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022>.

BURDOCK, G. A. et al. Avaliação de aspectos sanitários do ácido kójico em alimentos. **Regulatório e Farmacologia**, v. 33, n. 80, 2001, <https://doi.org/10.1006/rtph.2000.1442>.

VARJÃO, S. M. T. et al. (2022). Leishmanicidal activity of fungal bioproducts: A systematic review. **Fungal Biology Reviews**, v. 50, p. 91 – 113, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.01.001>.

FLORES-QUIROZ, V. I. et al. (2022). Pharmaceutical agents for the treatment of Chagas disease: patenting trends in the 2016–2021 period. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 11, n. 3, p. 97-110, Doi: [10.4155/ppa-2022-0005](https://doi.org/10.4155/ppa-2022-0005).

GEORGIADOU, S. P. et al. (2015). Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43-50, doi: [10.1515/jtim-2015-0002](https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0002).

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine Disponível em: therapy?. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25-40, doi: [10.2147/DDDT.S146521](https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521).

International Patent Classification (IPC). World intellectual property organization, 2020. Available in: <https://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo-rn2022-7-en-international-patent-classification-ipc.pdf> . Accessed in: 05 de julho de 2022.

KELLER, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167-180, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>.

NEVES, L. O. et al. (2011). Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 1092-1101, <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005>.

ROATT, B. M. et al. (2020). Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>.

SANTOS, A. S. et al. (2015). Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone (HMP) as a leishmanicidal agent. Assignee: Universidade Federal do Pará. US9115106B2. Aug. 25, 2015.

SPECIAN, V. et al. (2014). Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n4p%25p>.

ZACARIAS, D. A. et al. (2017). Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 6, p. 679-687, <https://doi.org/10.1111/tmi.12877>.

6 CONCLUSÕES

Ao fim deste trabalho, foi possível observar que os objetivos traçados no início foram alcançados. Ao mesmo tempo que foi possível a realização dos testes farmacológicos com os extratos fúngicos, onde os extratos 2FFLQ6 acetato e 2FFLQ6 acetona se mostraram promissores contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, foi realizada também uma revisão patentária acerca dos metabólitos fúngicos com atividade leishmanicida, onde foram selecionados quatro estudos que possuíam contribuições significativas. Ainda e cada vez mais se faz necessário a continuação das pesquisas de bioprospecção utilizando extratos fúngicos, a fim de encontrar um novo protótipo candidato a fármaco leishmanicida.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

APRÍGIO, Cesarino Junior Lima. Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana avaliados em sete unidades de saúde e estudo da fauna flebotomínica em áreas de três municípios do estado de Rondônia. 2013. **Tese de Doutorado**.

AFONSO, M. M. S. “Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana”. 2013. 172f. **Tese de Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

BRASIL. Marinha do Brasil. Comissão Interministerial para os Recursos do Mar. InfoCIRM abr 2020. Brasília: **Promar**, 2020. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/secirm/sites/www.marinha.mil.br/secirm/files/publicacoes/infocirm/2020/infocirm-abr2020.pdf>, Acesso em: 20 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do **Ministério da Saúde**, 190p. 2017.

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. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do **Ministério da Saúde**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.

BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf Acesso em: 09 de setembro de 2022.

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.

BRUNATI M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Elke G, Götlich E, de Hoog S, Genilloud O, Marinelli F (2009) Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Mar Genomics** 2:43–50

BURZA S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. **Lancet**. 2018 Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30126638.

CERUTTI, Pedro Henrique Pietrzaki et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Leishmaniasis. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, **Center for Disease Control and Prevention**, 2020. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 02 de Novembro de 2022.

DE FREITAS, Roberta Carvalho et al. Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Leishmania* sp.: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19328-19346, 2020.

ELKHAYAT, E. S.; IBRAHIM, S. M. R.; MOHAMED, G. A.; ROSS, S. A. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letter**, v. 31, n. 4, p. 1-7, 2015.

FIOANTAR - PROJETO FIOCRUZ NA ANTÁRTICA. Fundação Oswaldo Cruz. Curiosidades sobre o continente antártico. Rio de Janeiro: **Fiocruz**. Disponível em: <http://fioantar.fiocruz.br/node/86>. Acesso em: 05 nov. 2022.

FOGANHOLI, Josiane Nobre; ZAPPA, Vanessa. Importância da leishmaniose na saúde pública. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 9, n. 17, p. 1-45, 2011.

FIGUEIREDO, F.B.; et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2010;43(1):98-9.

GODINHO VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya N, Pupo D, Alves TMA, Sales PA, Romanha AJ, Zani CL, Cantrell CL, Rosa CA, Rosa LH (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME J** 7:1434–1451.

GONÇALVES, VN, Carvalho, CR, Johann, S. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária de comunidades fúngicas presentes em diferentes substratos da Antártida. **Polar Biol** 38 , 1143–1152 (2015).

GUERRA, J. A. O.; et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12-19, 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

LIBKIND, Diego; VAN BROOCK, María. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 687-692, 2006.

LI Y, Sun B, Liu S, Jiang L, Liu X, Zhang H, Che Y (2008) Bioactive asterric acid derivatives from the Antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. *J Nat Prod* 71:1643–1646

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

OGAKI, Mayara Baptistucci et al. Fungos presentes em sedimentos marinhos e lacustres da Antártica: taxonomia, diversidade e bioprospecção de metabólitos bioativos. 2019.

Organização Pan Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]. Núm. 10, dezembro de 2021. Washington, D.C.: OPS; 2021.

Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

Organização Mundial da Saúde. Informe Leishmanioses Nº 7 - Março de 2019. Disponível em:<<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019cdeishinformeepi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em 15 de outubro de 2022.

Organização Pan Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]. Núm. 10, dezembro de 2021. Washington, D.C.: OPS; 2021.

RATH, S.; et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. **Quim. Nov.** v. 26, p. 550–557, 2003.

ROATT, Bruno Mendes et al. Recentes avanços e novas estratégias no tratamento da leishmaniose. **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, v. 104, n. 21, pág. 8965-8977, 2020.

ROSA, Luiz Henrique et al. Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: **Fungi of Antarctica**. Springer, Cham, 2019. p. 1-17.

SILVA, I. P.; BRISSOW, E.; KELLNER FILHO, L. C.; SENABIO, J. SIQUEIRA, K. A.; VANDRESEN FILHO, S.; DAMASCENO, J. L.; MENDES, S. A.; TAVARES, D. C.; MAGALHÃES, L. G.; SALES JUNIOR, P. A.; JANUÁRIO, A. H.; SOARES, M. A. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus* - F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 3, 2017.

SOTO J, et al. Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 2018; 99(5): 1153-1155.

SERENO, D.; et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Ag. Chem.** v. 42, p. 3097–3102, 1998.

SANTIAGO, Alexandre Silva; DA ROCHA PITA, Samuel Silva; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.

SILVA, P. L., et al. *Epidemiologia da leishmaniose visceral em um município da Bahia*. Rev. Saúde.Com 2017; v13(3): 933-940.

TRIPATHI, V. C. et al. Lal A, Arockiaraj J, Pasupuleti M, Dikshit DK (2018) Natural products from polar organisms: structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. **Pol Sci**, v. 18, p. 147-166.

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

WYREPKOWSKI, Claudia Dantas Comandolli et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. e3352-e3352, 2020.