UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.

Henrique Pereira Ramos

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Henrique Pereira Ramos

Orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 25/04/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ramos, Henrique Pereira

Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. Ribeirão Preto, 2013.

117p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Said, Suraia.

1. Fungo endofítico. 2. *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. 3. Atividade antileishmania 4. Atividade esquistossomicida

FOLHA DE APROVAÇÃO

Henrique Pereira Ramos

Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Suraia Said

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais e irmãos,
à Glaucia, Olivia, Clovis e Raí,
familiares e amigos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Suraia Said pela orientação e constante dedicação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio, pela excelente colaboração, contribuições e disponibilização do Laboratório de Biotransformação – UNIFRAN.

À Profa. Angela Kaysel Cruz, pela colaboração na realização dos ensaios antileishmania e disponibilização do Laboratório de Parasitologia Molecular, FMRP – USP.

À Profa. Lizandra Guidi Magalhães, Laboratório de Pesquisa em Parasitologia – UNIFRAN, pela colaboração na realização dos ensaios de atividade antiparasitária frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

À Profa. Dra. Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado, ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa e ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, por suas contribuições, em especial as apresentadas durante o exame de qualificação, e disponibilização do Laboratório de Farmacognosia, FCFRP – USP.

À todos os professores que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Juliano Simões de Toledo, Laboratório de Parasitologia Molecular, FMRP – USP, por sua dedicação e todos os auxílios prestados para a realização dos ensaios antileishmania.

Aos técnicos, Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti, Viviane Ambrósio Trombela e Edmárcio da Silva Campos por todos os ensinamentos e disposição sempre presente em auxiliar-me.

Aos técnicos, Maria Teresa Picinoto Maglia e José Augusto Maulin, Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME), FMRP – USP, pelo auxílio, no processamento das amostras, manuseio dos equipamentos, aquisição e processamento de imagens, nos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas pós-graduandos e graduandos, por todas as discussões, sugestões e contribuições.

RESUMO

RAMOS, H. P. **Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc.** 2013. 117f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Estimativas apontam haver no mundo 12 milhões de pessoas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, estando 350 milhões de pessoas em situação de risco. A leishmaniose é um grave problema de saúde pública mundial e entretanto não há tratamentos eficientes para o controle desta doença. Fungos endofíticos são fontes promissoras de metabólitos secundários bioativos e isso se deve em parte a sua estreita interação com as plantas hospedeiras. Extratos de culturas do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc., isolado como endofítico de *Smallanthus sonchifolius* (yacon), demonstrou em estudos anteriores ser uma fonte promissora de metabólitos secundários distintos, apresentando atividades antibacteriana, antifúngica, citotóxica para linhagens de células tumorais e antiparasitária. Devido a elevada atividade antileishmania detectada, culturas do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. foram realizadas em duas etapas distintas de cultivo. Obteve-se 1,47g de extrato AcOEt, o qual foi posteriormente fracionado por cromatografia líquida a vácuo. As frações resultantes foram fracionadas por cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa. Dez substâncias foram isoladas, oito a partir de frações bioativas e suas estruturas foram elucidadas por análises de experimentos de RMN 1D: RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT e 2D: COSY ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C . As substâncias I e III apresentaram atividade esquistossomicida, causando 100% de morte nos parasitas quando avaliadas nas concentrações de 200 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram alterações morfológicas como o possível mecanismo de ação destas substâncias. As substâncias VII e IX, que parecem ser inéditas na literatura, apresentaram atividade antileishmania com valores de CI_{50} de 12,54 e 3,04 $\mu\text{g/mL}$ frente *Leishmania braziliensis* e 8,78 e 2,87 $\mu\text{g/mL}$ frente *L. chagasi*, respectivamente. O presente trabalho corrobora fungos endofíticos como uma fonte promissora, ainda pouco explorada, de novos metabólitos com atividade antileishmania e esquistossomicida.

Palavras-chave: Fungo endofítico, *Arthrinium state of Apiospora montagnei*, atividade antileishmania, atividade esquistossomicida.

ABSTRACT

RAMOS, H. P. **Isolation and identification of secondary metabolites with anti-parasitic activity from the endophytic fungus *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.** 2013. 117f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Leishmaniasis affects over 12 million people and 350 million people in 88 countries are at risk. Recognised as a major public health problem, leishmaniasis causes high morbidity and mortality levels. There are currently no vaccines and the available chemotherapy against leishmaniasis still suffers from high toxicity, serious side effects, require long-term treatment and present clinical resistance. Endophytic fungi are promising source of bioactive secondary metabolites due in part of their close interaction with the host plants. In previous studies the fungus *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc., isolated as endophytic fungus from *Smallanthus sonchifolius* (yacon), demonstrated to be a promising source of secondary metabolites with antibacterial, antifungal, antitumoral and antileishmanial activities. In view of the high antileishmanial activity previously detected, in the present study the endophytic fungus *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* was cultivated in a liquid medium under standardized culture condition, yielding 1.47 g of EtOAc extract, which was further fractionated by vacuum liquid chromatography, and the resulting fractions fractionated by liquid chromatography and high performance liquid chromatography. Ten compounds were isolated, nine from bioactive fractions. Their chemical structures were elucidated by analysis of NMR experiments 1D: RMN ^1H , RMN ^{13}C and DEPT and 2D: COSY ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C and HMBC ^1H - ^{13}C . The substances I and III showed schistosomicidal activity, causing 100% death of the parasites when evaluated at concentrations of 200 and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Analysis by scanning electron microscopy suggested that morphological changes are possibly the mechanism of action of these substances. Two new compounds, VII and IX, showed antileishmanial activity with IC_{50} values of 12.54 and 3.04 $\mu\text{g/mL}$ against *Leishmania braziliensis* and 8.78 and 2.87 $\mu\text{g/mL}$ against *L. chagasi*, respectively. The present work supports endophytic fungi as a promising source of new metabolites underexplored with antileishmanial and schistosomicidal activity.

Keywords: Endophytic fungi, *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei*, antileishmanial activity, schistosomicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.....	5
Figura 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da esquistosomose	8
Figura 3. Metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes do fungo endofítico <i>Edenia</i> sp.....	10
Figura 4. Metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes dos fungos endofíticos <i>Cochliobolus</i> sp.....	10
Figura 5. Fungo <i>Arthrinium</i> state of <i>Apiospora montagnei</i> Sacc.....	11
Figura 6. Substâncias produzidas pelo fungo <i>Arthrinium</i> state of <i>Apiospora montagnei</i> ou <i>Apiospora montagnei</i> , seu estado teleomorfo.....	12
Figura 7. Representação da realização de cultivos e obtenção de extratos.....	18
Figura 8. CCDC apresentando valores de R _f dos extratos AcOEt do fungo <i>Arthrinium</i> state of <i>Apiospora Montagnei</i> Sacc.....	26
Figura 9. Fluxograma do fracionamento dos extratos acetato de etila por cromatografia líquida a vácuo.....	27
Figura 10. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.2 por cromatografia líquida clássica.....	28
Figura 11. Fluxograma do fracionamento da subfração AAM.2.6 por cromatografia líquida clássica.....	28
Figura 12. Cromatograma da substância I (fração AAM.2.5).....	29
Figura 13. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.3 por cromatografia líquida clássica.....	29
Figura 14. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.3.4 por cromatografia líquida clássica.....	30
Figura 15. Cromatograma da substância V.....	30
Figura 16. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.4 por cromatografia líquida clássica.....	31
Figura 17. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.4.8 por cromatografia líquida clássica.....	32
Figura 18. Cromatograma da Substância II.....	32
Figura 19. Cromatograma da substância III e IV.....	33
Figura 20. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.5 por CLC.....	33

Figura 21. Cromatograma da fração AAM.5.5.....	34
Figura 22. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.6 por cromatografia líquida clássica.....	34
Figura 23. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.7 por cromatografia líquida clássica.....	35
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da substância V.....	36
Figura 25. Estrutura da <i>R</i> -(-)-meleina (substância I).....	37
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da substância I.....	39
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da substância I.....	40
Figura 28. Mapa de contornos de HMQC da substância I.....	41
Figura 29. Mapa de contornos de HMBC da substância I.....	42
Figura 30. Estrutura da <i>cis</i> -(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-hidroximeleina (substância III).....	44
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da substância III.....	45
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da substância III.....	46
Figura 33. Mapa de contornos de COSY da substância III.....	47
Figura 34. Mapa de contornos de HMQC da substância III.....	48
Figura 35. Mapa de contornos de HMBC da substância III.....	49
Figura 36. Estrutura do tirosol (substâncias II e VI).....	53
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da substância II.....	54
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C da substância II.....	55
Figura 39. Mapa de contornos de COSY da substância II.....	56
Figura 40. Mapa de contornos de HMBC da substância II.....	57
Figura 41. Estrutura química do ergosterol.....	60
Figura 42. Espectro de RMN ^1H da substância X (CDCl_3 , 400 MHz).....	62
Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C da substância X (CDCl_3 , 100 MHz).....	63
Figura 44. Estrutura química da substância VIII (VII).....	65
Figura 45. Espectro de RMN ^1H da substância VIII.....	72
Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C da substância VIII.....	73
Figura 47. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação do hidrogênio H-6 com os carbonos C-5, C-8 e C-9.....	66
Figura 48. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre os hidrogênios do grupo metila H-21 com o carbono C-17 em δ 139,9.....	67

Figura 49. Mapas de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre o hidrogênio H-14 (δ 3,45) com os carbonos carbonílicos em δ 195,5 e 208,9.....	67
Figura 50. Mapa de contornos HMQC da substância VIII. Correlação entre os carbonos carbinólicos em δ 80,5, 83,6, e 85,9 com seus respectivos sinais de hidrogênio.....	68
Figura 51. Espectro de DEPT 135 da substância VIII. Demonstração de que os carbonos carbinólicos em δ 71,8 e 83,1 são quaternários.....	69
Figura 52. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre os hidrogênios metílicos H-18 e H-19 com o carbono carbinólico em δ 83,6.....	70
Figura 53. Espectro de HMBC mostrando a correlação entre o hidrogênio H-22 (δ 5,05) com o carbono C-29 (δ 170,9) e com o carbono C-17 (δ 139,9).....	70
Figura 54. Estrutura química da substância IX (IV).....	74
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H da substância IX.....	78
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C da substância IX.....	79
Figura 57. Mapa de contornos HMQC da substância IX.....	80
Figura 58. Espectro de HMBC mostrando a correlação entre os hidrogênios da metila H-19 com o carbono em δ 75,4.....	75
Figura 59. Espectro de HMBC demonstrando a correlação dos sinais em δ 2,04 e 5,04 com a carbonila do éster do grupamento acetóxi (δ 170,8).....	76
Figura 60. Efeito da substância I no pareamento de casais de <i>S. mansoni</i>	82
Figura 61. Efeito da substância IV no pareamento de casais de <i>S. mansoni</i>	82
Figura 62. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com controle negativo.....	87
Figura 63. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com controle positivo.....	88
Figura 64. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com controle positivo.....	88
Figura 65. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com controle positivo.....	89
Figura 66. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	89
Figura 67. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	90

Figura 68. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	90
Figura 69. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	91
Figura 70. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	92
Figura 71. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	92
Figura 72. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	93
Figura 73. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	93
Figura 74. Eletromicrografia de <i>S. mansoni</i> submetido ao tratamento com a substância I.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de fracionamento por CLC.....	20
Tabela 2 – Rendimento de extratos AcOEt obtidos do fungo <i>Arthrinium state of A. montagnei</i>	25
Tabela 3 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância I.....	38
Tabela 4 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância III.....	44
Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância II.....	53
Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz da substância X.....	61
Tabela 7 - Dados de RMN ^{13}C e ^1H em CDCl_3 , da substância VIII.....	71
Tabela 8 - Dados de RMN ^{13}C e ^1H em CDCl_3 , da substância IX.....	77
Tabela 9 – Efeito <i>in vitro</i> das substâncias I-III frente <i>S. mansoni</i>	83
Tabela 10 – Efeito <i>in vitro</i> das substâncias V e IX frente <i>S. mansoni</i>	84
Tabela 11 – Efeito <i>in vitro</i> das substância X e controles frente <i>S. mansoni</i>	85
Tabela 12 – Atividade antileishmania frente <i>L. major</i>	95
Tabela 13 – Determinação do Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de frações frente a diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	95
Tabela 14 – Determinação do Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de substâncias frente a diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
AAM	Extratos do fungo <i>Arthrinium state of Apiospora montagnei</i>
AcOEt	Acetato de etila
APRT	Adenina-fosforribosil-transferase
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL	Cromatografia líquida clássica
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dq	Duplo quadrupeto
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
J	Constante de acoplamento
MTT	3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	singleto
t	tripleto

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmaniose.....	
1.2 Esquistossomose.....	7
1.3 Fungos como fontes de metabólitos secundários bioativos.....	8
1.4 Metabólitos secundários do fungo <i>Arthrinium state of Apiospora montagnei</i> Sacc.	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Obtenção de inóculo.....	17
3.2 Condições de cultivo.....	17
3.3 Extratos.....	17
3.4 Fracionamento dos extratos acetato de etila obtidos de culturas do fungo <i>Arthrinium state of Apiospora montagnei</i> por cromatografia líquida a vácuo.....	19
3.5 Fracionamento por cromatografia líquida clássica.....	19
3.6 Análise das frações dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	20
3.7 Elucidação estrutural.....	20
3.8 Determinação da atividade esquistossomicida.....	21
3.8.1 Obtenção e manutenção dos parasitas adultos de <i>S. mansoni</i>	21
3.8.2 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> frente vermes adultos.....	21
3.8.3 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura.....	22
3.9 Atividade leishmanicida.....	23
3.9.1 Cepas de <i>Leishmania</i> utilizadas e preparo das amostras.....	23
3.9.2 Determinação da atividade leishmanicida.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Rendimento dos extratos.....	25
4.2 Fracionamento dos extratos acetato de etila obtidos de culturas do fungo <i>Arthrinium state of Apiospora montagnei</i> por cromatografia líquida a vácuo.....	26
4.3 Fracionamento por cromatografia líquida clássica.....	27
4.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas.....	35
4.4.1 Substância I – meleina.....	37
4.4.2 Substância III – <i>cis</i> -(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-hidroximeleina.....	43
4.4.3 Substância II e VI – tirosol.....	52
4.4.4 Substância X – Ergosterol.....	60
4.5 Atividade esquistossomicida.....	81
4.6 Atividade antileishmania.....	94
5. CONCLUSÕES	98

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
---	-----------

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa que tem por agente etiológico aproximadamente 20 espécies do gênero *Leishmania*, protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae. São parasitas que sobrevivem em macrófagos, cuja infecção se dá pela forma promastigota metaciclíca, que é injetada na pele do hospedeiro por picada de mosquitos flebotomíneos, insetos vetores do parasito. As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas diretamente por macrófagos ou após a apoptose de neutrófilos recrutados ao local de infecção. Os promastigotas internalizados nos macrófagos são direcionados ao fagolisossomo, no qual diferenciam-se na forma aflagelada, denominada amastigota. As formas amastigotas representam o estágio replicativo do parasita, periodicamente liberados pela célula hospedeira através de um mecanismo ainda não esclarecido, reinfectando assim, rapidamente outras células fagocitárias, macrófagos ou células dendríticas e algumas células não fagocíticas, como fibroblastos. Estes protozoários ocasionam doença aguda, que pode evoluir da cura espontânea de lesões cutâneas à desfiguração severa de mucosas ou letalidade principalmente pela forma visceral, ou doença crônica latente que pode persistir por toda a vida do hospedeiro (McCONVILLE et al., 2007).

As principais formas clínicas desta enfermidade são a cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e a visceral, que é a mais severa, podendo ser fatal principalmente se não tratada, ocasionando mais de 50.000 mortes por ano (FAUCHER; PIARROUX, 2011). A leishmaniose cutânea é ocasionada principalmente por *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) mexicana*, a leishmaniose mucocutânea por *L. (Viannia) braziliensis* e a leishmaniose visceral causada por *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*.

Nas Américas, reconhecem-se atualmente 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil os principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar são: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, seus vetores são insetos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, principalmente as espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *L.*

whitmani, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). O principal agente etiológico da leishmaniose visceral comumente encontrado no Brasil é a espécie *L. (L.) chagasi* e seus vetores são as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998).

A leishmaniose é considerada a segunda doença parasitária no mundo, considerando o número de pessoas em risco em áreas endêmicas e o número de casos de pessoas infectadas, afetando populações em áreas tropicais e subtropicais (TOLEDO et al., 2010), acomete populações em países da Europa, África, Ásia e Américas (PEACOCK et al., 2007). Estimativas apontam que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo, havendo 1,5-2 milhões de novos casos a cada ano e 350 milhões de pessoas em 88 países em situação de risco (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011). Evidencia-se assim, o grave problema de saúde pública em âmbito mundial decorrente de infecções por espécies de *Leishmania*.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, no período de 2001-2012, 300.509 casos de leishmaniose tegumentar confirmados foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 709 destes evoluíram ao óbito e 43,92% do total dos casos notificados foram reportados em áreas urbanas. No mesmo período, foram notificados 40.883 casos de leishmaniose visceral, destes 2.669 evoluíram ao óbito, sendo 69,07% do total dos casos notificados reportados em áreas urbanas. Estes dados mostram que a leishmaniose no Brasil é uma doença com prevalência urbana significativa.

A leishmaniose é considerada uma zoonose, com exceção da leishmaniose visceral causada pela espécie *Leishmania donovani*, com ocorrência na Índia e África (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011), e a leishmaniose cutânea, principalmente, causada pela espécie *Leishmania tropica*, com ocorrência no norte da África, leste do Mediterrâneo e oeste da Ásia (HANAFI et al., 2013), as quais são consideradas antroponoses.

No Brasil, inicialmente considerada uma zoonose silvestre, com transmissão em áreas de vegetação primária, a leishmaniose tornou-se uma zoonose rural ou periurbana devido a colonização de áreas de matas residuais pelo homem e adaptação do vetor ao peridomicílio e nos dias de hoje pode ser considerada uma antroponose endêmica em muitas regiões urbanas do país, nas quais, mesmo que raramente, ocorre transmissão humana da leishmaniose por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos ou mesmo através do repasto sanguíneo pelo

inseto vetor (HARHAY et al., 2011).

Mamíferos, como roedores e canídeos silvestres são considerados reservatórios primários de *Leishmania* e com a urbanização do ciclo de transmissão da doença, animais domésticos e sinantrópicos passaram a assumir importante papel na transmissão da leishmaniose em regiões periurbanas e urbanas (QUARESMA et al., 2011).

O papel do cão, como reservatório de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, ainda é incerto e pelo menos para *L. braziliensis*, o homem é provavelmente o principal reservatório do parasito e não o cão (DANTAS-TORRES, 2007). No ciclo urbano da leishmaniose visceral parece haver uma correlação que implica o cão como reservatório do agente etiológico (LIMA et al., 2012). Todavia, o papel de outros animais na transmissão da doença tem sido investigado, evidências apontam que a presença de gambás em áreas de transmissão é um fator de predisposição para a infecção canina. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, área urbana endêmica de leishmaniose visceral, foi encontrada alta prevalência do marsupial *Didelphis albiventris*, gambá-de-orelha-branca, infectado por *Leishmania chagasi*, sendo sugerida a participação deste animal na transmissão da leishmaniose visceral (HUMBERG et al., 2012). Muitos estudos tem demonstrado a infecção de felinos, principalmente gatos domésticos, por leishmaniose visceral. Em Araçatuba, área urbana endêmica de leishmaniose visceral, uma alta prevalência de gatos infectados foi observada e quando infectados os gatos apresentam lesões dérmicas com alta presença de parasitismo, sugerindo-os como uma provável fonte de infecção para flebotomíneos (VIDES et al., 2011; MAIA; CAMPINO, 2011).

Mesmo sendo o cão considerado o principal reservatório do agente etiológico da leishmaniose visceral em áreas urbanas, o extermínio de cães infectados, procedimento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, parece não surtir efeito na redução do acometimento da doença no homem, seja por ineficácia na detecção de cães infectados, obstrução do acesso aos cães por seus proprietários ou pela rápida reposição do animal sacrificado por novos cães (GRIMALDI et al., 2012). Caso não haja uma redução efetiva dos vetores, a presença de animais infectados, mesmo que epidemiologicamente insignificante, pode reestabelecer a leishmaniose visceral canina na região, possibilitando novamente a transmissão ao homem. Parece claro que a detecção precoce de cães infectados, monitoramento por órgão de vigilância e o tratamento destes (MIRÓ et al., 2011), bem como a

utilização de colares impregnados com inseticidas (FERROGLIO et al., 2008) são estratégias essenciais de controle para evitar a disseminação de infecções caninas e consequentemente as humanas (MAIA; CAMPINO, 2011).

No Brasil, as medidas efetivas preconizadas pelo Ministério da Saúde, para o controle de leishmaniose humana, são o rápido diagnóstico e tratamento, controle dos vetores pelo uso de inseticidas, melhoria das condições sanitárias nas áreas em que ocorre o surgimento de focos da doença e em áreas onde ocorre a leishmaniose visceral, a eliminação de cães com resultados positivos obtidos por imunofluorescência indireta e/ou ensaios imunoenzimático.

Devido a mudanças climáticas, alterações comportamentais dos vetores flebotomíneos, aumento do trânsito de pessoas em viagens regionais, internacionais e intercontinentais, transfusões sanguíneas, treinamentos de soldados em regiões endêmicas, deslocamento de refugiados de guerra, crescente migração de zonas rurais para áreas urbanas e o aumento da população imunocomprometida (ALVAR et al., 2008), observaram-se nos últimos anos mudanças na distribuições geográficas dos agentes etiológicos e de vetores (DUJARDIN et al., 2008) e aumento no número de infecções em regiões não endêmicas (SHAW, 2007; SCHÖNIAN et al., 2008), resultando na urbanização da doença (AGUILAR et al., 1998; WERNECK et al., 2002; JERONIMO et al., 2004) e consequentemente, agravando seu tratamento e controle (CHAPPUIS et al., 2007), além de aumentar a resistência dos parasitas aos fármacos disponíveis no mercado.

Os principais tratamentos para leishmaniose (Figura 1) baseiam-se na administração parental de fármacos altamente tóxicos como antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina, assim como a utilização de alguns antibióticos azólicos e aminoglicosídeos (CROFT; COOMBS, 2003). Recentemente foi introduzido na terapia da leishmaniose o primeiro fármaco de uso oral, a miltefosina (AGRAWAL; SINGH, 2006).

Os fármacos antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como fármacos de primeira escolha por aproximadamente 60 anos e após aproximadamente 15 anos, denotou-se resistência a estes fármacos em regiões endêmicas, principalmente na Índia. Resistência aos demais fármacos utilizados no tratamento de leishmaniose, como por exemplo, a anfotericina B, miltefosina, pentamidina, antibióticos azólicos e aminoglicosídeos, frente a determinadas espécies e algumas cepas específicas, é também amplamente reportada na literatura (DENIS et al., 2012; CROFT et al.,

2006; COELHO et al., 2004; GOURBAL et al., 2004; HADIGHI et al., 2006; PONTE-SUCRE, 2003).

Figura 1. Principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose

Os principais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose no Brasil são o antimoniato de N-metilglucamina, como fármaco de primeira escolha, e como fármacos de segunda escolha, a anfotericina B ou anfotericina B lipossomal e o isotionato de pentamidina, indicado para leishmaniose tegumentar, sendo proibidas suas utilizações para o tratamento canino, a fim de evitar ao parasita possível desenvolvimento de resistência.

Os antimoniais pentavalentes são pro-fármacos que requerem redução biológica para a forma trivalente para que sejam ativos, acredita-se que estes fármacos inibem a biossíntese de macromoléculas em amastigotas, possivelmente

através da inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos. A anfotericina B é um antibiótico poliênico que apresenta toxicidade seletiva para esteróis presentes nas membranas citoplasmáticas do parasita, como o ergosterol, ocasionando a formação de poros, que alteram o equilíbrio de íons resultando em morte do parasita. A pentamidina age acumulando-se no parasita, por ligar-se ao DNA do cinetoplasto, inibe a síntese de poliamina e a atividade da topoisomerase I. Mas, não está totalmente elucidado seu efeito na alteração de potencial da membrana mitocondrial (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2006; CRUZ et al., 2009).

Entre os fármacos em estudo clínicos, a miltefosina, inicialmente investigada quanto sua atividade antineoplásica, estimula os sistemas hematopoiético e imunológico, ativando células T e macrófagos e aumentando a produção de interferon- γ . No parasita o mecanismo de ação principal não está bem estabelecido. Dentre os diversos mecanismos de ação destacam-se efeitos no metabolismo de fosfatidilinositol, no fluxo de cálcio e na proteína quinase C, danos e alterações de membranas e na biossíntese de fosfolípídeos e transduções de sinais. Em bactérias, a paramomicina liga-se a subunidades 30S de ribossomos inibindo a síntese de proteínas, em *Leishmania* seu efeito parece estar relacionado a ribossomos mitocondriais, induzindo disfunções respiratórias e despolarização de membrana mitocondrial. A imidazoquinolina tem por mecanismo de ação a estimulação da produção de óxido nítrico por macrófagos. O mecanismo de ação da sitamaquina ainda não é conhecido e possivelmente age promovendo alterações na cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2006; CRUZ et al., 2009).

O desenvolvimento de vacinas para leishmaniose iniciou-se aproximadamente há 70 anos. A primeira geração de vacinas constituiu-se em parasitas mortos e apresentava baixa eficácia, a segunda geração de candidatos à vacinas surgiu na década de 90, constituindo-se em parasitas vivos modificados geneticamente, bactérias ou vírus contendo genes de *Leishmania* expressando antígenos, e antígenos purificados. Alguns destes candidatos à vacinas apresentaram alta eficiência em testes clínicos, porém estas vacinas são restritas somente a algumas espécies de *Leishmania*, sendo a vacina de segunda geração Leishmune[®] licenciada para uso veterinário. A terceira geração de candidatos baseia-se em vacinas de DNA, e apresenta maior estabilidade comparada a vacinas recombinantes de segunda geração (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008). Oliveira et al.

(2009) sugerem a necessidade de desenvolver vacinas que combinem antígenos da superfície de *Leishmania*, antígenos intracelulares de *Leishmania* e antígenos salivares de flebotomíneos, bem como a utilização da vacina BCG como adjuvante, para que obtenham-se vacinas de alta eficácia.

Até o presente momento não há nenhuma vacina para uso humano presente no mercado, e os candidatos a vacinas apresentam diversos problemas relacionados à estabilidade, imunogenicidade e proteção frente às diferentes espécies de *Leishmania*. Soma-se a isso, o fato de que o desenvolvimento de vacinas representa um dos mais altos custos para o controle de doenças infecciosas, desta forma muitos dos candidatos à vacinas para doenças negligenciadas, que acometem os países em desenvolvimento, como leishmaniose, malária, esquistossomose e diversas outras, possivelmente não chegaram ao uso clínico devido ao lucro insuficiente para sustentar seu desenvolvimento por grandes indústrias farmacêuticas (KEDZIERSKI et al., 2006).

O conhecimento genômico e análises comparativas por biologia molecular, de várias espécies de *Leishmania* tem possibilitado uma melhor compreensão sobre a biologia do parasita, sua patogenicidade e virulência, possibilitando a identificação de novos alvos terapêuticos (TOLEDO et al., 2010).

Dentro das perspectivas de tratamento para leishmaniose, incluem-se o desenvolvimento racional de protótipos para fármacos baseados em alvos potenciais e mecanismos de ação específicos (SRINIVAS et al., 2009; WIRTH, 2001; TORRES-SANTOS et al., 2009), o DNA do cinetoplasto, kDNA (WILSON et al., 2008), enzimas envolvidas na biossíntese de poliamina (HEBY et al., 2007), canais de cálcio (TEMPONE et al., 2009), membrana plasmática (BERROCAL-LOBO et al., 2009) e enzimas fosforribosil-transferases, responsáveis pela reciclagem de purino-nucleotídeos, como a adenina-fosforribosil-transferase (AMBROZIN et al., 2005), assim como a prospecção de novos metabólitos secundários de micro-organismos selecionados através de ensaios direcionados (SERENO et al., 2007; MONTE-ALEGRE et al., 2006; LANG et al., 2005; SEN et al., 2007; SHARLOW et al., 2009). Todas essas estratégias são promissoras para o desenvolvimento de fármacos efetivos para o controle desta doença.

1.2 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematodas pertencentes ao gênero *Schistosoma*, assim como a leishmaniose, é uma das principais doenças tropicais negligenciadas, de alta prevalência e morbidade, endêmica em aproximadamente 70 países (BOTELHO-MACHADO et al., 2010). Esta doença afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, ocasionando mais de 280.000 mortes por ano, havendo 779 milhões de pessoas em situação de risco (CUNHA et al., 2012).

Atualmente o praziquantel e a oxamniquina (Figura 2) são os principais fármacos disponíveis para o tratamento da esquistossomose, sendo somente o praziquantel efetivo frente às diferentes espécies de *Schistosoma* causadoras da esquistossomose, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*. Contudo, o surgimento de resistência a ambos os fármacos utilizados para o tratamento da esquistossomose evidencia a necessidade de busca de novas substâncias bioativas que apresentem atividade esquistossomicida (LUZ et al., 2012).

Figura 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da esquistossomose

1.3 Fungos como fontes de metabólitos secundários bioativos

Produtos naturais oriundos de micro-organismos são fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Metabólitos secundários de micro-organismos são amplamente utilizados em âmbito industrial e farmacêutico, como fatores de crescimento de plantas e animais, antibióticos, antiparasitários, antitumorais, imunossupressores e redutores de níveis de colesterol (DEMAIN; ADRIO, 2008). Produtos microbiológicos são também amplamente

comercializados como produtos para agricultura e saúde animal, como biopesticidas incluindo agentes antifúngicos, bioinseticidas, bioherbicidas e agentes antiparasitários, principalmente anti-helmínticos (DEMAIN, 2007).

Dentre os micro-organismos como fontes de novos metabólitos secundários bioativos destacam-se os fungos endofíticos (ALY et al., 2011). São considerados fungos endofíticos aqueles que vivem toda ou uma parte do seu ciclo de vida no interior de plantas, sem causar sintomas de doenças visíveis (TAN; ZOU, 2001). Podem habitar seu hospedeiro intracelularmente ou intercelularmente, e estão presentes em quaisquer órgãos das plantas e em todos os estágios de seu desenvolvimento (SCHULZ; BOYLE, 2005). As interações entre fungos endofíticos e plantas são dinâmicas, variando de simbiose mutualística (READMAN et al., 2002) a comensalismo (DECKERT et al., 2001) e até mesmo fungos fitopatógenos e saprofíticos latentes ou fungos micorrízicos em estágios iniciais de colonização podem ser caracterizados como endofíticos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Em todas as interações endofíticas, o caráter assintomático de colonização dá-se através de um equilíbrio de antagonismos, entre a virulência do fungo e a defesa da planta, na qual há produção de metabólitos de interesses opostos por parte de ambos. Fungos secretam enzimas e outros metabólitos, necessários ao processo de infecção, e a planta por sua vez, produz metabólitos responsáveis por conter esta infecção (SCHULZ; BOYLE, 2005). Contudo esta interação é benéfica para ambos, pois fungos endofíticos produzem uma ampla diversidade de metabólitos bioativos que agem na planta, como hormônios de crescimento (BATTISTA et al., 1990), promovendo tolerância a estresses abióticos (GAO et al., 2005) e influenciando na fotossíntese (SCHARDL et al., 2004) além de inibirem herbivoria e infecção por patógenos (ARNOLD et al., 2003). Em troca são supridos com nutrientes e favorecidos quanto a reprodução e dispersão (RUDGERS et al., 2004).

Esta interessante relação ecológica confere aos fungos endofíticos uma ampla diversidade de metabólitos secundários, muitos dos quais apresentam em bioensaios altas atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica, anti-inflamatória, antiparasitária, dentre outras (GUNATILAKA, 2006; TANSUWAN et al., 2007; LI et al., 2007; FIRÁKOVÁ et al., 2007; BORGES et al., 2009; TENGURIA et al., 2011). Todavia, poucos metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes de fungos endofíticos são reportados na literatura (Figuras 3 e 4),

destacando-se os produzidos pelos fungos endofíticos *Penicillium janthinellum* (MARINHO, et al., 2005), *Edenia* sp. (MARTÍNEZ-LUÍS, et al., 2008; MARTÍNEZ-LUÍS, et al., 2009), *Mycosphaerella* sp. (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011) e *Cochliobolus* sp. (CAMPOS, et al., 2008).

Figura 3. Metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes do fungo endofítico *Edenia* sp. 1 - preusomerina EG₁, 2 - palmarumicina CP₂, 3 - palmarumicina CP₁₇, 4 - palmarumicina CP₁₈, 5 - CJ-12,371 6 - palmarumicina CP₁₉ e 7 - 5-metilocracina

Figura 4. Metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes dos fungos endofíticos *Cochliobolus* sp. (1 - cochlioquinona A e 2 - isocochlioquinona A), *Penicillium janthinellum* (3 - citrinina) e *Mycosphaerella* sp. (4 - cercosporina)

1.4 Metabólitos secundários do fungo *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc.

O fungo, *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc. (= *Arthrimum arundinis*), quando cultivado em meio BDA a 30 °C por um período de 96 horas, apresenta micélio vegetativo esbranquiçado, de aspecto aveludado com marcações de crescimento radiais e hifas vegetativas pouco ramificadas, hialinas e septadas (Figura 5).

Figura 5. Fungo *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc. cultivado por 96 horas em meio BDA. Aumento original x3.2, Esteriomicroscópio MC80X Zeiss (RAMOS, 2008).

É de distribuição cosmopolita, possui hábitos saprofítico, fitopatogênico e endofítico e já foi isolado de solo, de sementes, de folhas e galhos, de folhas, galhos e rizomas em decomposição, de ninho de pássaro e em associação à líquens. (CHLEBICKI, 2009; CHONG; SHERIDAN, 1982; HUTCHISON, 1999; ROY et al., 2000; OSONO; TAKEDA, 2002; THORMANN et al., 2004).

Há relatos na literatura deste fungo ser produtor de metabólitos secundários bioativos (Figura 6), como a arundifungina (CABELLO et al., 2001), que apresenta atividade antifúngica. Em seu estado teleomorfo, *Apiospora montagnei*, produz metabólitos secundários citotóxicos (KLEMKE et al., 2004), a apiosporamida (ALFATAFTA et al., 1994) que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral (WILLIAMS et al., 2005; SHIBAZAKI et al., 2004) e os inibidores de proteassoma 20S, TMC-95A-D, promissores em tratamentos de doenças inflamatórias e autoimunes, relevantes na ativação do NF- κ B encontrado em diversas doenças inflamatórias (KOHNO et al., 2000).

Figura 6. Substâncias produzidas pelo fungo *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* ou *Apiospora montagnei*, seu estado teleomorfo.

Ressalta-se que uma única espécie fúngica quando proveniente de diferentes habitats produz distintos e diversificados metabólitos secundários, de acordo com as características evolutivas das cepas resultantes dos diferentes nichos ecológicos. A interação hospedeiro-específica de fungos endofíticos possibilita a evolução de cepas fisiológica e bioquimicamente adaptadas, que muitas vezes assegura uma identidade única na produção de metabólitos secundários (FIRÁKOVÁ et al., 2007).

Para a plena exploração da potencialidade de produção de metabólitos secundários bioativos por fungos endofíticos é requerido que se estabeleça as condições de cultivo que possam mimetizar, em condições laboratoriais, as características bióticas e abióticas que resultam na produção de metabólitos secundários. Contudo, a compreensão das interações entre fungos endofíticos e plantas ainda é escassa, sendo necessários esforços no estudo destas interações.

Pouca atenção é dada ao fato de que raramente uma planta apresenta-se colonizada por somente uma espécie de micro-organismo endofítico, usualmente observa-se a presença diversificada de colonização e diretamente ou indiretamente há interações entre os micro-organismos endofíticos presentes em uma planta. Nestas comunidades, potencialmente cada produto natural pode impactar no perfil metabólico de outros micro-organismos que dividem o mesmo habitat.

A rhizoxina, uma substância fitotóxica que acreditava-se ser produzida pelo fungo *Rhizopus microsporus*, foi observada na verdade como sendo sintetizada por uma bactéria endo-simbionte pertencente ao gênero *Burkholderia* que habita o citosol do fungo fitopatógeno, o micro-organismo endo-simbionte não só é responsável pela produção da fitotoxina como também evade os mecanismos de resistência fúngica e controla a diferenciação e esporulação do fungo hospedeiro (KUSARI et al., 2012).

Outro exemplo, que clarifica a complexidade das interações que resultam no estabelecimento de simbioses mutualistas entre fungos endofíticos e plantas, demonstra que o fungo endofítico *Curvularia protuberata* possibilita que a planta *Dichanthelium lanuginosum* habite solos geotermiais do parque Yellowstone National Park, Estados Unidos da América. Quando cultivados isoladamente estes organismos não são capazes de se desenvolver em temperaturas superiores a 38 °C, porém quando há a infecção da planta pelo fungo endofítico, a interação mutualista permite o desenvolvimento da planta em solos com temperatura de 65 °C. Em condições naturais, o fungo endofítico *Curvularia protuberata*, apresenta-se

altamente infectado pelo vírus denominado “*Curvularia thermal tolerance* vírus”, em condições laboratoriais, na ausência de infecção viral, este fungo endofítico não confere termotolerância a planta hospedeira. Portanto a planta somente é capaz de desenvolver-se em solos geotermiais quando ou se infectada pelo fungo endofítico, e este por vírus, caracterizando uma tripla simbiose (MÁRQUEZ et al., 2007).

Estes elegantes estudos exemplificam que um maior conhecimento dos aspectos biológicos de interações fúngicas poderá propiciar futuros estudos mais efetivos na obtenção de produtos naturais oriundos de micro-organismos.

Até o presente momento não há relatos na literatura sobre atividade antiparasitária de metabólitos secundários do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc., exceto aos estudos por nós realizados (RAMOS; SAID 2011). O fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* apresentou em seus extratos, de acordo com as condições de cultivo as quais foi submetido, atividades antibacteriana (RAMOS et al., 2010), antifúngica, citotóxica para linhagens de células tumorais e expressiva atividade antileishmania (RAMOS; SAID 2011). Esta significativa atividade antileishmania foi observada no extrato acetato de etila proveniente do cultivo do fungo por 9 dias em meio Czapek em pH 4, a 30° C sob agitação constante a 120 rpm, em ensaios de inibição da enzima parasitária adenina-fosforribosil-transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae* (66,41% de inibição) e em ensaio *in vitro*, realizado de acordo com procedimentos estabelecidos por Dutta et al. (2005), frente as espécies *Leishmania (V.) braziliensis* H3227 e *Leishmania major* LV39 em concentração inibitória média (CI₅₀) de 11,84 µg/mL e 2,97 µg/mL, respectivamente (dados não publicados).

Sugere-se assim, a produção de metabólitos secundários com elevada atividade antileishmania, pelo fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei*, com possível mecanismo de ação, a inibição da enzima APRT.

Devido a ausência de fármacos eficientes e com baixa toxicidade para o tratamento da leishmaniose humana e canina e ao fato do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* ter apresentado-se, previamente, como um bom candidato para produção de compostos com atividade antileishmania, o isolamento e identificação estrutural destes metabólitos secundários podem, além de resultar em possíveis novos candidatos a fármacos, contribuir para um melhor entendimento dos possíveis mecanismos de ação no parasita. Devido a alta incidência e ausência de alternativas para o tratamento da esquistossomose, o qual é praticamente

dependente de um único fármaco o praziquantel, as substâncias isoladas foram também avaliadas quanto sua atividade contra *S. mansoni*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Obter e identificar metabólitos secundários com atividades antileishmania e esquistossomicida produzidos pelo fungo endofítico *Arthrhimium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos podem ser assim enumerados:

1. Cultivar o fungo endofítico *Arthrhimium* state of *Apiospora montagnei* e obter extrato bruto dos caldos de culturas
2. Fracionar o extrato bruto por métodos cromatográficos e avaliar a atividade antileishmania de frações e subfrações para direcionar o isolamento de substâncias com atividade antileishmania.
3. Isolar e identificar as estruturas dos metabólitos secundários bioativos.
4. Avaliar as atividades antileishmania e esquistossomicida das substâncias isoladas.

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc., originalmente isolado de raízes delgadas de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) como endofítico (RAMOS et al., 2010), encontra-se depositado na Coleção de Culturas - Micoteca URM - Departamento de Micologia/CCB/UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife/PE. No laboratório de Enzimologia Industrial FCFRP-USP, este fungo é mantido por repiques sucessivos em meio BDA armazenados sob refrigeração a 4 °C.

3.1 Obtenção de inóculo

O micro-organismo foi cultivado em meio BDA em placa de Petri, incubado por 7 dias a 30 °C. Após este período acrescentou-se 10 mL de água destilada esterilizada, e através de raspagem superficial da cultura obteve-se uma suspensão para o inóculo.

3.2 Condições de cultivo

A produção de metabólitos secundários foi realizada em duas etapas distintas e consecutivas de cultivo. Primeiramente os esporos e micélio obtidos do cultivo de uma placa de Petri, como anteriormente descrito, foram inoculados em 200 mL de meio pré-fermentativo, de acordo com Jackson et al (1993). A cultura foi incubada por 48 horas a 30° C sob agitação constante (120 rpm). Em seguida, a massa micelial obtida, foi assepticamente coletada por filtração e reinoculada em 400 mL de meio fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992) em pH 4. A cultura foi incubada por 9 dias a 30° C sob agitação constante (120 rpm).

Separou-se o fluido da cultura da massa micelial por filtração a vácuo e posteriormente realizou-se partição com acetato de etila (3x200 mL), resultando no extrato acetato de etila (AcOEt).

3.3 Extratos

Com o intuito de obter massa suficiente de extrato AcOEt para o

desenvolvimento deste projeto, foram realizados 62 cultivos, conforme descrito previamente e os extratos foram agrupados em 4 amostras de acordo com o período de obtenção (Figura 7).

Devido ao grande número de cultivos efetuados, para assegurar uma homogeneidade da produção de metabólitos secundários, avaliou-se o perfil cromatográfico dos extratos obtidos por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Merck) medindo 5X20 cm.

Os extratos foram dissolvidos em metanol, aplicados nas placas cromatográficas e estas colocadas em cuba contendo a fase móvel hexano/acetato de etila/ ácido acético (7:12:1). Após o desenvolvimento, revelaram-se as placas utilizando vanilina sulfúrica.

Realizou-se 62 cultivos fúngicos, os cultivos foram submetidos a separação do fluido por filtração a vácuo, partição com acetato de etila (3x200mL) e posterior concentração em evaporador rotativo. De acordo com a capacidade e disponibilidade de utilização da câmara incubadora, a distribuição dos cultivos deu-se da seguinte forma:

Figura 7. Representação da realização de cultivos e obtenção de extratos.

3.4 Fracionamento dos extratos acetato de etila obtidos de culturas do fungo *Arthrimum state of Apiospora montagnei* por cromatografia líquida a vácuo

Utilizou-se coluna cromatográfica de dimensões 20 cm x 6,5 cm, preenchida com 15 cm de sílica 60 H. Os 4 extratos AcOEt obtidos foram agrupados em uma única amostra, denominada AAM, incorporada em sílica gel 60 (0063-0,2 mm) e aplicada no topo da coluna empacotada. A coluna foi eluída nas fases móveis: hexano (100% - 700 mL), Hex/AcOEt (4:1 – 700 mL), Hex/AcOEt (3:2 – 700 mL), Hex/AcOEt (2:3 – 700 mL), Hex/AcOEt (1:4 – 700 mL), acetato de etila (100% - 700 mL) e metanol (100% - 700 mL), obtendo-se 7 frações, submetidas a evaporação a vácuo, sendo denominadas: AAM.1, AAM.2, AAM.3, AAM.4, AAM.5, AAM.6 e AAM.7, respectivamente.

3.5 Fracionamento por cromatografia líquida clássica

As frações provenientes do fracionamento por cromatografia líquida a vácuo foram submetidas a fracionamentos por cromatografia líquida clássica, assim como suas sub-frações. Utilizaram-se colunas cromatográficas de dimensões variadas preenchidas com sílica gel 60 (0063-0,2 mm), eluídas em fases móveis previamente estabelecidas por CCDC, acrescidas em 1% de ácido acético e posteriormente eluídas utilizando-se acetato de etila (100% - 100 mL) e metanol (100% - 100 mL), em exceção as frações AAM.4.8, AAM.4.8.3 e AAM.7 posteriormente eluídas somente por metanol. As condições de fracionamento estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições de fracionamento por CLC

Frações	Coluna			Fase móvel
	Massa (mg)	Diâmetro (cm)	Preenchimento (cm)	
AAM.2	189,1	2,0	20	Hex/AcOEt 4:1 (300 mL)
AAM.3	96,7	2,0	38	Hex/AcOEt 2:3 (400 mL)
AAM.3.4	41	2,0	35	Hex/AcOEt 3:2 (300 mL)
AAM.4	203,1	3,0	29,5	Hex/AcOEt 2:3 (300 mL)
AAM.4.4	38,8	2,0	30	Hex/AcOEt 3:7 (300 mL)
AAM.4.8	55,2	2,0	30	Hex/AcOEt 2:3 (300 mL)
AAM.4.8.3	26,3	2,0	30	Hex/AcOEt 3:7 (300 mL)
AAM.5	132	2,0	20	Hex/AcOEt 1:4 (300 mL)
AAM.6	51,2	2,0	40	Hex/AcOEt 4:1 (300 mL)
AAM.7	543,4	3,0	22,5	Hex/AcOEt 3:2 (400 mL)
				Hex/AcOEt 1:4 (400 mL)

3.6 Análise das frações dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Análises qualitativas das frações foram realizadas por CLAE, em cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A. As amostras foram solubilizadas em metanol (1mg/mL), sendo aplicados 20µL. Empregou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4mm x 250 mm. Utilizaram-se fases móveis pertinentes, vazão de 1 mL/min e 35 minutos de eluição.

3.7 Elucidação estrutural

As elucidações estruturais das substâncias isoladas foram baseadas em experimentos de RMN 1D: RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT e 2D: COSY ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C , efetuados pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – Departamento de Química – Universidade de São Carlos, sob supervisão do Professor Doutor Antonio Gilberto Ferreira, em espectrômetro de RMN marca Bruker modelo AVANCE III, 14,1 e 9,4 Tesla (600 e 400 MHz).

3.8 Determinação da atividade esquistossomicida

Os ensaios de avaliação esquistossomicida foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia – LAPP – Universidade de Franca, sob supervisão da Professora Doutora Lizandra Guidi Magalhães.

3.8.1 Obtenção e manutenção dos parasitas adultos de *S. mansoni*

O parasita *Schistosoma mansoni* LE (Luis Evangelista) é mantido no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob a coordenação do professor Doutor Vanderlei Rodrigues, por passagens em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos BALB/c.

Por perfusão do sistema porta-hepático sob condições assépticas, casais de vermes adultos foram recuperados de camundongos, após oito semanas de infecção prévia por 200 cercárias. Após coleta, os parasitas foram mantidos em meio RPMI-1640 tamponado com HEPES 20 μ M, pH 7,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina + estreptomicina), sendo posteriormente utilizados para os experimentos.

3.8.2 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* frente vermes adultos

A atividade esquistossomicida foi avaliada de acordo com os procedimentos estabelecidos por Luz et al. (2012). Em placas estéreis de 24 poços contendo meio RPMI-1640 (HEPES 20 μ M, pH 7,5, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos), foi transferido um casal de parasitas para cada poço das placas, sendo estas posteriormente incubadas em estufa umidificada contendo 5% CO₂ a 37 °C. Após 24 horas de incubação, amostras das substâncias isoladas, solubilizadas em dimetil sulfoxido (DMSO) e diluídas seriadamente em meio RPMI-1640, foram acrescidas nos poços no intervalo final de concentração de 12,5 a 200 μ g/mL. Como controle positivo, utilizou-se 12,5 μ g/mL de praziquantel em substituição as amostras e como controle negativo, 0,1% de DMSO na ausência de quaisquer substâncias. As placas foram reincubadas nas condições anteriormente descritas por 120 horas e

monitoradas a cada 24 horas com auxílio de microscópio de luz invertida, sendo avaliadas as condições gerais dos parasitas: pareamento, atividade motora, e taxa de mortalidade.

A redução da atividade motora foi classificada como pouco significativa, na ocorrência de atividade motora diminuída em relação ao apresentado pelo controle negativo, e significativa, na ocorrência de atividade motora mínima, apresentando os parasitas contrações esporádicas da cabeça e corpo. A morte dos parasitas foi definida como ausência de movimentos por mais de 2 minutos de observação.

Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e os resultados obtidos analisados através de cálculos estatísticos, médias, desvio padrão e respectivos intervalos de confiança, utilizando o programa GraphPad Prism 5.

3.8.3 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura

Os experimentos de avaliação ultraestrutural foram realizados no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME), Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP – USP.

Com o intuito de verificar possíveis alterações morfológicas no tegumento de *S. mansoni* após tratamento *in vitro* com a substância I, realizaram-se ensaios de atividade esquistossomicida conforme previamente descrito, utilizando 200 µg/mL da substância I, 12,5 µg/mL de praziquantel como controle positivo ou 0,1% de DMSO como controle negativo. Resumidamente, após 120 horas de incubação descartou-se o meio presente nos poços e os parasitas foram lavados imediatamente em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 37 °C e fixados por uma hora em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio a 37 °C, e por mais uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os parasitas foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados por uma hora em solução de tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato de sódio, desidratados em soluções seriadas de etanol 50–100%, processados em secador de ponto crítico de CO₂ e montados sob fitas adesivas dupla face em pinos de alumínio (“stubs”). Após metalização com camada de ouro foram realizadas análises ultraestruturais e obtenção de imagens em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6510LV.

3.9 Atividade antileishmania

Os ensaios de atividade antileishmania foram realizados pelo doutorando no Laboratório de Parasitologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob supervisão da Professora Doutora Angela Kaysel Cruz e do Doutor Juliano Simões de Toledo.

3.9.1 Cepas de *Leishmania* utilizadas e preparo das amostras

A atividade antileishmania do extrato AAM, frações e substâncias isoladas, obtidos de cultivos do fungo *Arthrrium state of Apiospora montagnei*, foi avaliada frente a formas promastigotas de *Leishmania major* LV39 (MHOM/SU/59/P/LV39), *Leishmania (V.) braziliensis* H3227 e *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Para realização dos ensaios foram realizados cultivos das cepas de *Leishmania* em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e antibióticos (penicilina + estreptomicina), a 26 °C por 48 horas. As formas promastigotas foram lavadas em solução salina esterilizada e contadas em câmara de Neubauer.

As amostras foram solubilizadas em DMSO 0,625% e diluídas seriadamente em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado.

3.9.2 Determinação da atividade antileishmania

A avaliação de atividade antileishmania das amostras foi realizada através do método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium, MTT (MOSMANN, 1983) de acordo com modificações propostas por Dutta et al. (2005). As cepas de *Leishmania* foram inoculadas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato em densidade final de 2×10^5 /mL. As amostras foram acrescidas em diluições seriadas, perfazendo um volume final de 200 µl por poço. Em substituição ao extrato AAM, frações, sub-frações e substâncias isoladas foram utilizados como controle positivo G418 (gentamicina), higromicina ou anfotericina B e como controle negativo 0,625% de DMSO (V/V).

As placas foram incubadas por 72 horas a 26° C, após este período os poços

foram acrescentados em 10 µg/poço de MTT (10 mg/mL em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado) e as placas foram posteriormente reincubadas por 4 horas a 26 °C. Ao termino da incubação, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e cada poço acrescentado em 200 µl de DMSO para ressuspensão do “pellet” formado. A absorbância foi lida em 492 nm em espectrofotômetro de placas e os resultados analisados através de cálculos estatísticos, médias e respectivos intervalos de confiança de regressão não linear, através do programa Origin 8.5. Os resultados foram expressos em CI_{50} .

Os ensaios foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes.

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos

Foi obtido um rendimento total de 1,462 g dos extratos AcOEt, valor este, satisfatório para suprir a necessidade de massa para realizar o isolamento e a identificação dos metabólitos secundários produzidos, como também para os ensaios de atividades antiparasitárias.

Fungos endofíticos apresentam plasticidade fenotípica e capacidade de produção de diversos metabólitos secundários mesmo quando isolados e cultivados em escala laboratorial. Pequenas variações nas condições de cultivo podem resultar em grande alteração no perfil de metabólitos secundários produzidos, sendo crítico o estabelecimento de parâmetros rígidos de cultivos a serem utilizados (SCHERLACH; HERTWECK, 2009).

Observaram-se valores distintos de rendimento dos extratos provenientes dos cultivos realizados (tabela 2). Estes valores distintos podem ser resultantes de variações nos níveis de produção de metabólitos secundários pelo fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei*, como também, serem consequentes dos processos de obtenção dos extratos.

A análise dos perfis cromatográficos dos extratos AcOEt provenientes dos cultivos realizados demonstrou, através da uniformidade entre os perfis cromatográficos obtidos, que mesmo havendo variações nos rendimentos dos extratos houve ausência de variações na produção de metabólitos secundários pelo fungo endofítico em estudo, assegurando a eficácia dos procedimentos de cultivos realizados (Figura 8).

Tabela 2 - Rendimento de extratos AcOEt obtidos do fungo *Arthrinium state of A. montagnei*

Extratos/Cultivos	Massa dos extratos (mg)	Rendimento (mg/L)
1. (10 cultivos)	362,9	90,725
2. (09 cultivos)	251,5	69,861
3. (31 cultivos)	615,5	49,637
4. (12 cultivos)	243,0	50,625

Figura 8. CCDC apresentando valores de Rf dos extratos AcOEt do fungo *Arthrinium state of Apiospora Montagnei* Sacc. **A**- Extrato.1, **B** – Extrato.2, **C** – Extrato.3 **D** – Extrato . 4. FM: Hex/AcOEt/ácido acético (7:12:1).

4.2 Fracionamento dos extratos acetato de etila obtidos de culturas do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* por cromatografia líquida a vácuo

Os 4 extratos acetato de etila obtidos foram agrupados em uma única amostra fracionada por cromatografia líquida a vácuo, resultando em 7 frações distintas (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma do fracionamento dos extratos acetato de etila por cromatografia líquida a vácuo.

4.3 Fracionamento por cromatografia líquida clássica

Com exceção da fração AAM.2, a qual foi submetida ao fracionamento por cromatografia líquida clássica devido ao perfil cromatográfico por CCDC ser pouco complexo (dados não apresentados), o que sugeria a presença de um composto majoritário além da grande disponibilidade de massa, os demais fracionamentos foram priorizados de acordo com a atividade antileishmania, disponibilidade de massa e complexidade de perfil cromatográfico por CCDC e CLAE.

As subfrações resultantes dos fracionamentos das frações AAM.2, AAM.3, AAM.4, AAM.5, AAM.6 e AAM.7 foram submetidas, para agrupamento de suas subfrações, à cromatografia em camada delgada comparativa em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Merck), usando fases móveis apropriadas, observadas sob luz ultravioleta (254nm e 366nm) e reveladas com vanilina sulfúrica.

O fracionamento de AAM.2 resultou em 10 subfrações, os rendimentos das subfrações estão apresentados na figura 10. De acordo com o perfil cromatográfico por CCDC, a subfração AAM.2.5 denominada substância I, foi submetida à análise por CLAE (Figura 12), utilizou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4mm x 250 mm. Como fase móvel foi utilizado o sistema água/MeOH 1:4 (desenvolvimento isocrático), vazão de 1 mL/min e 35

minutos de eluição.

A subfração AAM.2.6 foi submetida ao fracionamento por CLC e propiciou o isolamento da substância denominada substância X (Figura 11). Esta substância foi submetida aos ensaios de RMN para determinação estrutural sem confirmação prévia por CLAE.

Figura 10. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.2 por cromatografia líquida clássica.

Figura 11. Fluxograma do fracionamento da subfração AAM.2.6 por cromatografia líquida clássica.

Figura 12. Cromatograma da substância I (fração AAM.2.5). FE: coluna cromatográfica de fase reversa CLC-ODS (M). FM: Eluição isocrática, MeOH/H₂O 4:1, vazão de 1 mL/min por 35 minutos, detecção em 254 nm.

Foram obtidas 9 subfrações resultantes do fracionamento da fração AAM.3, os rendimentos das subfrações estão apresentados na figura 13. A subfração AAM.3.4 foi fracionada, resultando em 6 subfrações, os rendimentos das subfrações estão apresentados na figura 14.

Figura 13. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.3 por cromatografia líquida clássica.

Figura 14. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.3.4 por cromatografia líquida clássica.

A subfração AAM.3.4.4, denominada substância V, foi submetida à análise cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4mm × 250 mm. Como fase móvel foi utilizado o sistema água/MeOH 1:4 (desenvolvimento isocrático), vazão de 1 mL/min e 25 minutos de eluição (Figura 15).

Figura 15. Cromatograma da substância V. FE: coluna cromatográfica de fase reversa CLC-ODS (M). FM: Eluição isocrática, MeOH/H₂O 4:1, vazão de 1 mL/min, detecção em 254 nm.

As subfrações resultantes do fracionamento da fração AAM.4 foram agrupadas em 11 subfrações, os rendimentos das subfrações estão apresentados na figura 16. Visualizou-se na subfração AAM.4.8 grande acúmulo de precipitados no frasco em que foi coletada, acrescentou-se diclorometano a fração e proporcionalmente a evaporação do solvente houve a formação de cristais brancos

nas paredes do frasco, estes cristais foram lavados diversas vezes com diclorometano gelado e foram posteriormente coletados com auxílio de espátula, denominando-os substância II (Figuras 16 e 18). O restante da fração AAM.4.8 foi submetido ao fracionamento por CLC, assim como sua subfração AAM.4.8.3. Estes fracionamentos resultaram no isolamento da substância VI (Figura 17). A subfração AAM.4.4 foi fracionada, resultando em 6 subfrações, os rendimentos das subfrações são apresentados na figura 16. A subfração 4.4.4 foi submetida à cromatografia preparativa por CLAE, utilizou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4mm x 250mm. Como fase móvel foi utilizado o sistema água/MeOH 1:4 (desenvolvimento isocrático), vazão de 1 mL/min e 20 minutos de eluição. Obteve-se assim, as substâncias III e IV (Figuras 16 e 19).

Figura 16. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.4 por cromatografia líquida clássica.

Figura 17. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.4.8 por cromatografia líquida clássica.

Figura 18. Cromatograma da Substância II. FE: coluna cromatográfica de fase reversa CLC-ODS (M). FM: Eluição isocrática, MeOH/H₂O 4:1, vazão de 1 mL/min, detecção em 210 nm.

Figura 19. Cromatograma da substância III e IV. FE: coluna cromatográfica de fase reversa CLC-ODS (M). FM: Eluição isocrática, MeOH/H₂O 4:1, vazão de 1 mL/min, detecção em 190 nm.

O fracionamento da fração AAM.5 resultou em 12 subfrações, cujos rendimentos estão apresentados na figura 20. A subfração AAM.5.5 foi submetida à cromatográfica preparativa por CLAE (Figura 21), utilizou-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4mm x 250 mm. Como fase móvel foi utilizado o sistema água/MeOH 1:4 (desenvolvimento isocrático), vazão de 1 mL/min e 20 minutos de eluição. A cromatografia preparativa por CLAE da subfração AAM.5.5 resultou no isolamento das substâncias VII, VIII e IX (Figura 20).

Figura 20. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.5 por cromatografia líquida clássica.

Figura 21. Cromatograma da fração AAM.5.5. FE: coluna cromatográfica de fase reversa CLC-ODS (M). FM: Eluição isocrática, MeOH/H₂O 4:1, vazão de 1 mL/min, detecção em 254 nm.

Obtiveram-se 8 subfrações resultantes do fracionamento da fração AAM.6, os rendimentos das subfrações estão demonstrados na figura 22. Estas subfrações apresentaram perfil cromatográfico complexo quando analisadas por CCDC (dados não apresentados) sugerindo a presença de vários metabólitos secundários presentes em cada uma das subfrações, não sendo possível o isolamento de substâncias dessas subfrações devido a pouca massa apresentada. De acordo com estes resultados, a atividade antileishmania de subfrações da AAM.6 não foi avaliada.

Figura 22. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.6 por cromatografia líquida clássica.

As subfrações resultantes do fracionamento da fração AAM.7 foram agrupadas em 11 subfrações, os rendimentos das subfrações estão apresentados na figura 23. O fracionamento e isolamento de substâncias das subfrações da fração AAM.7 foi preterido de acordo com os resultados da fração em ensaios de atividade antileishmania.

Figura 23. Fluxograma do fracionamento da fração AAM.7 por cromatografia líquida clássica.

4.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias isoladas tiveram suas estruturas químicas determinadas por análises de experimentos de RMN 1D e 2D, em exceção a substância V, a qual não foi elucidada devido a ausência de atividade nos ensaios antiparasitários e de acordo com a análise do espectro de RMN de ^1H , que sugeriu tratar-se de uma substância em mistura (Figura 24).

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da substância V ($\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$, 500 MHz).

4.4.1 Substância I – meleina

O espectro de RMN ^1H da substância I (Tabela 3, Figura 26) apresentou dois dubletos com deslocamento químico em δ 6,69 (H-7) e δ 6,89 (H-5) e um tripleto em δ 7,41 (H-6), atribuídos aos hidrogênios aromáticos, evidenciando um anel aromático tri-substituído, um singlete em δ 11,03, característico de grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático, e um dublete em δ 1,53 (H-9) sugerindo a presença de hidrogênios metílicos. O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 3, Figura 27) apresentou seis sinais característicos de anel aromático tri-substituído, três carbonos metínicos com deslocamentos em δ 115,9 (C-7), 117,6 (C-5) e 135,8 (C-6) e três carbonos quaternários em δ 108 (C-8a), 139,1 (C-4a) e 161,9 (C-8). O espectro de HMQC (Figura 28) permitiu a atribuição dos átomos de hidrogênios ligados a seus respectivos carbonos.

A comparação dos dados espectroscópicos obtidos, e da análise do poder rotatório específico, $[\alpha]_D^{20} - 68,0$ (c 0,9, metanol), com os dados apresentados pela literatura, permitiu atribuir a estrutura química da substância I como *R*-(-)-meleina (EFDI et al., 2007; ISLAM et al., 2007).

Figura 25. Estrutura da *R*-(-)-meleina (substância I)

Tabela 3 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância I

C/H	Meleina*			substância I		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ 75 MHz	$\delta^1\text{H}$ 500 MHz	Mult J (Hz)
9	20,7	1,53	3H, d, 6,3	20,5	1,53	3H, d, 6,3
4	34,5	2,93	2H, d, 7,2	34,35	2,93	2H, d, 7,2
3	76,2	4,73	1H, m	75,82	4,73	1H, m
8a	108,2			108,03		
7	115,9	6,69	1H, d, 7,2	115,9	6,69	1H, d, 7,2
5	117,9	6,89	1H, d, 8,4	117,6	6,89	1H, d, 8,4
6	136,1	7,41	1H, dd, 8,4, 7,2	135,8	7,41	1H, t, 7,9
4a	139,3			139,1		
8	162,1			161,9		
OH-8		11,03	1H, s		11,03	1H, s
1	169,9			169,7		

* Valores apresentados por Islam et al. (2007), CDCl_3 , 300 MHz e 75 MHz.

Figura 26. Espectro de RMN ^1H da substância I (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C da substância I (CDCl_3 , 75 MHz).

Figura 28. Mapa de contornos HMQC da substância I (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 29. Mapa de contornos HMBC da substância I (CDCl_3 , 500 MHz).

4.4.2 Substância III – *cis*-(3*R*,4*R*)-hidroximeleina

A substância III apresentou-se como um sólido branco amorfo. No espectro de RMN ^1H (Tabela 4, Figura 31), podem ser observados dois dubletos com deslocamentos químicos em δ 6,92 ($J=7,9$ Hz) e δ 7,03 ($J=7,9$ Hz) e um tripleto em δ 7,53 atribuídos aos hidrogênios aromáticos, evidenciando um anel aromático trissubstituído, um dubleto em δ 1,59 com valor de $J=6,5$ Hz sugerindo a presença de hidrogênios metílicos e um singlete em δ 11,03, característico de grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático.

O experimento de HMQC (Figura 34) permitiu a atribuição dos átomos de hidrogênios ligados a seus respectivos carbonos.

No mapa de contornos de COSY (Figura 33) observam-se os acoplamentos entre o hidrogênio metínico em 4,70 com os hidrogênios em δ 1,59 e δ 4,58, enquanto no mapa de contornos de HMBC (Figura 35) as correlações dos hidrogênios em δ 1,59 com os carbonos em δ 78,13 (C-3) e 67,2 (C-4) e do hidrogênio metínico (H-3) com os carbonos metílico e o carbono metínico C-4 podem ser observadas, indicando a presença de um grupo hidroxila ligado ao carbono C-4. Os três sinais atribuídos a carbonos quaternários aromáticos não foram observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 32), sendo observados somente no mapa de contornos de HMBC.

A constante de acoplamento de H-4 com H-3, $J=2,1$ Hz, sugere estes hidrogênios em relação *cis*, junto ao resultado da análise do poder rotatório específico, $[\alpha]_D^{20} - 28,0$ (c 0,8, metanol), atribui-se a essa estrutura química a substância *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina, estando os dados espectroscópicos em concordância ao apresentado pela literatura (ASHA et al., 2004; CABRAS et al., 2006; DJOUKENG et al., 2009).

Figura 30. Estrutura da *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina (substância III)

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância III

C/H	<i>cis</i> -4-hidroximeleina*				substância III			
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Mult <i>J</i> (Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ 100 MHz	$\delta^1\text{H}$ 400 MHz	Mult <i>J</i> (Hz)	HMBC
1	162,0				162,0			
3	77,9	4,67	dq, 1,5;6,5		78,13	4,70	dq, 2,1; 6,5	
4	67,1	4,55	Bs	C-3, C-4a	67,2	4,58	d, 2,1	C-3, C-4a
				C-5				C-5, C-8a
4a	140,8				140,8			
5	118,1	6,90	d, 7,0	C-4, C-7	118,2	6,92	d, 7,9	C-4, C-7, C-8a
6	137,0	7,47	t, 7,0	C-4a	136,82	7,53	t, 7,9	C-4a, C-8
7	118,4	7,01	d, 7,0	C-5, C-8a	118,6	7,03	d, 7,9	C-5, C-8a
8	162,0				162,0			
OH-8		11,01	S	C-7, C-8		11,03	s	C-7, C-8, C-8a
8a	106,9				106,9			
Me-3	15,9	1,56	d, 6,5	C3-C4	15,9	1,59	d, 6,5	C3-C4

* Valores apresentados por Asha et al. (2004), CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz.

Figura 31. Espectro de RMN ^1H da substância III (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C da substância III (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura 33. Mapa de contornos COSY da substância III (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 34. Mapa de contornos HMQC da substância III (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 35. Mapa de contornos HMBC da substância III (CDCl_3 , 400 MHz).

A meleina e a *cis*-4-hidroximeleina são substâncias comumente isoladas de fungos fitopatogênicos e endofíticos, plantas e insetos, muitas vezes concomitantemente. Estas substâncias são reportadas como bioativas e como moléculas sinalizadoras de interações ecológicas, principalmente em formigas.

A fitotoxicidade é uma das principais atividades investigadas nestas substâncias. A *R*-(-)-meleina e a *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina isoladas do fungo fitopatogênico *Botryosphaeria obtusa*, causaram em folhas de videiras var. Gamay, necrose total na concentração de 3 µg/mL (DJOUKENG et al., 2009). Isoladas do fungo fitopatogênico *Sphaeropsis sapinea*, a *R*-(-)-meleina apresentou toxicidade severa para *Pinus radiata* e moderada para tomateiro, na concentração de 50 µg/mL. Curiosamente, os diastereoisômeros *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina e (3*R*,4*S*)-(-)-4-hidroximeleina não apresentaram-se bioativos quando testados isoladamente, apresentando atividade fitotóxica quando testados em mistura, na proporção de 6,5:1 respectivamente, sugerindo uma possível sinergia entre ambos (CABRAS et al., 2006). Contrariamente, quando isoladas do fungo fitopatogênico *Neofusicoccum parvum*, a *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina apresentou alta atividade fitotóxica em tomateiros, já o diastereoisômero (3*R*,4*S*)-(-)-4-hidroximeleina apresentou moderada atividade, quando avaliadas em $0,13 \times 10^{-3}$ M (EVIDENTE et al., 2010). Por outro lado a meleina produzida pelo fungo fitopatogênico *Phoma tracheiphila* induziu sintomas fitotóxicos em folíolos de tomateiro na concentração de 100 µg/mL, além de toxicidade em larvas de *Artemia salina* na concentração de 200 µg/mL (PARISI et al., 1993).

Embora apresente atividade fitotóxica, a *R*-(-)-meleina isolada da planta *Ficus formosana* f. *formosana* e de um fungo endofítico não identificado, apresentou ausência de atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais ($CI_{50} > 20 \mu M$) Hep G2, PLC/PRF/5, Raji e THP1 (SHEU et al., 2005) e frente às linhagens de células de adenocarcinoma gástrico ATCC Nr CRL-1739 e de fibroblastos MRC-5 ($CI_{50} > 1000 \mu M$) (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005). Entretanto, a *S*-(+)-meleina proveniente do fungo endofítico *Annulohypoxylon squamulosum* isolado planta medicinal *Cinnamomum* sp., apresentou moderada atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais MCF-7 ($CI_{50} = 21,03 \mu g/ml$), NCI-H460 ($CI_{50} = 12,16 \mu g/ml$) e SF-268 ($CI_{50} = 11,74 \mu g/ml$) (CHENG et al., 2012).

A meleina e a *cis*-4-hidroximeleina foram também amplamente avaliadas em ensaios de atividade antimicrobiana. Isoladas do fungo *Microsphaeropsis* sp., o qual foi coletado em associação com a esponja marinha *Myxilla incrustans*, apresentaram

moderada atividade antifúngica, quando avaliadas em 50 µg, frente aos fungos *Eurotium repens* e *Ustilago violacea* (HÖLLER et al., 1999). Quando produzidas pelos fungos endofíticos *Botryosphaeria rhodina* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009) e *Botryosphaeria mamane*, isolados da planta *Garcinia mangostana*, apresentaram-se inativas (CIM >128 µg/mL) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* meticilina-resistente SK1 (PONGCHAROEN et al., 2007). Isoladas de um fungo endofítico não identificado, PSU-N24, com similaridade molecular à espécies dos gêneros *Nigrospora*, *Apiospora* e *Arthrinium*, foram avaliadas quanto suas atividades antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antituberculose, sendo reportadas somente como fracamente ativas frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* meticilina-resistente (CIM >128 µg/mL) (SOMMART et al., 2008).

A *R*-(-)-meleina, isolada de diferentes espécies de fungo endofíticos pertencentes ao gênero *Pezicula*, apresentou em ensaios de difusão por disco, atividades antifúngica frente a *Ustilago violacea* e a *Eurotium repens*, antibacteriana frente ao *Bacillus megaterium* e a *Escherichia coli*, algicida frente a *Chlorella fusca* e atividade herbicida, em ensaio de inibição de germinação de sementes de *Lepidium sativum* e *Medicago sativa* (SCHULZ et al., 1995). Quando isolada do fungo endofítico *Nigrospora* sp. de raízes de *Moringa oleifera* Lam., apresentou-se inativa (CIM₅₀ >100µg/mL) frente aos fungos *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Pestalotia diospyri*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*, apresentando atividade somente frente ao fungo *Botrytis cinerea*, com CIM₅₀ de 49,2µg/mL (ZHAO et al., 2012).

Afora as atividades fitotóxica e antimicrobiana, reportam-se para a meleina, isolada do fungo *Aspergillus ochraceus* proveniente de sedimento marinho, inibição de protease do vírus da hepatite C com CI₅₀ de 35 µmol/L, resultado considerado bastante promissor (DAI et al., 2001; WOHLFARTH; EFFERTH, 2009), e inibição de síntese de prostaglandina em ensaio de atividade anti-inflamatória *in vitro* (CI₅₀ = 340 µM), quando isolada da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (PONGPRAYOON et al., 1991).

As substâncias *R*-(-)-meleina e *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina foram também isoladas do fungo fitopatogênico *Diplodia africana*, isolado da planta *Phoenicean juniper* (EVIDENTE et al., 2012). A meleina foi isolada do fungo endofítico de cana-de-açúcar *Epicoccum nigrum* (ARAÚJO et al., 2012) e das plantas *Solidago canadensis* (ZENG et al., 2012), *Rhodiola kirilowii* (Regl) Maxim. (YANG et al., 2011)

e *Millettia leucantha* (RAYANIL et al., 2011). Da planta *Uvaria hamiltonii*, reporta-se o isolamento da substância *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina (ASHA et al., 2004). Além destas atividades a meleina e 4-hidroximeleina são reportadas também como feromônios sexuais e de trilhas, sendo isoladas das espécies de formigas *Camponotus quadrisectus* (VOEGTLE et al., 2008) *Camponotus femoratus* (SEIDEL et al., 1990) *Camponotus ramulorum* (TORRES et al., 2001) *Camponotus vagus* (BLUM et al., 1987), *Lasius fuliginosus* (KERN et al., 1997) *Rhytidoponera metallica* (BROPHY et al., 1981) e *Crematogaster deformis* (ATTYGALLE et al., 1989), e da lepidoptera *Grapholitha molesta* (NISHIDA et al., 1982).

A produção das substâncias *R*-(-)-meleina e a *cis*-(3*R*,4*R*)-hidroximeleina por fungos endofíticos, incluindo o fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei*, devido as atividades biológicas reportadas pela literatura, pode estar relacionada ao desenvolvimento de simbiose mutualista, interação comumente observada entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras, ou ainda ser resultante da transição para interações fitopatogênicas devido a fitotoxicidade apresentada.

4.4.3 Substância II e VI – tirosol

Através da análise comparativa dos dados espectroscópicos obtidos, demonstrou-se que as substâncias codificadas como II e VI correspondem a uma mesma substância, desta forma as codificações anteriormente apresentadas foram mantidas somente para discernir as frações das quais provêm, e foram reportados somente os dados de RMN obtidos para a substância II.

Observou-se no espectro de RMN ^1H (Tabela 5, Figura 37) a presença de um par de dubletos com deslocamentos químicos em δ 7.09 e δ 6.77 com multiplicidades e constantes de acoplamento típicas de hidrogênios aromáticos de anel dissustituído em posição *para*. A análise do mapa de contornos de COSY (Figura 39) demonstrou que os hidrogênios aromáticos somente correlacionam-se entre si, comprovando a presença de um anel aromático *para* dissustituído. Em δ 2.82 observou-se um tripleto relativo a presença de um grupo metilênico benzílico e em δ 3,83 um tripleto relativo a presença de um grupo metilênico carbinólico. No espectro de RMN ^{13}C (Tabela 5, Figura 38) foram observados quatro sinais δ 130,2, 115,6, 64 e 38,5, correspondentes aos carbonos C-4,8, C-5,7, C-1 e C-2,

respectivamente. Os sinais referentes aos carbonos C-3 (δ 130) e C-6 (δ 155) foram somente observados no mapa de contornos de HMBC (Figura 40).

A identificação da substância II foi confirmada através da comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os dados apresentados na literatura (OWEN et al., 2000; CHEN et al., 2004; GUZMÁN-LÓPEZ et al., 2007).

tirosol

Figura 36. Estrutura do tirosol (substâncias II e VI)

Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 da substância II

C/H	tirosol*				substância II			
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ (75 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	COSY	HMBC
1	62,6	3,51 t (6,5)	H-2	C-2, 3	64	3,82 t (6,5)	H-2	C-2, 3
2	38,3	2,59 t (6,5)	H-1	C-1, 4, 8	38,5	2,80 t (6,5)	H-1	C-1, 4, 8
3	129,4				130	-		
4,8	129,7	6,98 d (8,5)	H-5, 7	C-4, 6, 8	130,2	7,10 d (8,3)	H-5, 7	C-4, 6, 8
5,7	114,9	6,65 d (8,5)	H-4, 8	C-3, 6, 7	115,6	6,78 d (8,3)	H-4, 8	C-3, 6, 7
6	155,5	-		C-5, 6, 7	155	-		C-5, 6, 7
OH	-	9,14 s			-	-		

* Valores apresentados por Chen et al. (2004), DMSO-d_6 , 500 MHz e 125 MHz.

Figura 37. Espectro de RMN ^1H da substância II (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C da substância II (CDCl_3 , 75 MHz).

Figura 39. Mapa de contornos COSY da substância II (CDCl₃, 400 MHz).

Figura 40. Mapa de contornos HMBC da substância II (CDCl_3 , 400 MHz).

O tirosol tem sido isolado de plantas (YANG et al., 2011; JU et al., 2012) e de fungos, fitopatógenos (GUZMÁN-LÓPEZ et al., 2007) e endofíticos (SUMARAH et al., 2008). É um potente antioxidante (CHEN et al., 2012) e uma das principais substâncias antioxidantes presentes em azeites de oliva extra virgem (ROMERO; BRENES, 2012) e vinhos (FRANQUET-GRIELL et al., 2012).

Em ensaios *in vivo*, o tirosol prolongou a longevidade do nematoda *Caenorhabditis elegans* e foi demonstrado que este efeito é mediado por incremento de termotolerância e resistência a estresse oxidativo (CAÑUELO et al., 2012). A potencialidade do tirosol no tratamento e prevenção de doenças vasculares tem sido objeto de diversos estudos, foram demonstrados efeitos antiapoptótico em células musculares cardíacas (SUN et al., 2012), prevenção de disfunções endoteliais relacionadas a doenças vasculares (PALMIERI et al., 2012), inibição de síntese de prostaglandinas e prevenção da oxidação de lipoproteína de baixa densidade, evento relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose (VIVANCOS; MORENO, 2008). Além destas atividades, esta substância também apresenta efeito neuroprotetor, prevenindo neurônios de danos ocasionados pela substância neurotóxica 5-S-cisteinil-dopamina que está associada a doença de Parkinson (VAUZOUR et al., 2010).

O tirosol apresenta atividade antifúngica frente ao fungo *Gibberella pulicaris*, um dos principais fitopatógenos de batatas (SLININGER et al., 2004), moderada atividade frente a diferentes espécies de *Candida* (MARCOS-ARIAS et al., 2011) e atividade antibacteriana frente as bactérias *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CUEVA et al., 2012).

Em ensaios de fitotoxicidade em tomateiro, o tirosol apresentou moderada atividade fitotóxica (EVIDENTE et al., 2010). Porém, o tirosol não inibiu a germinação de sementes e o crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana*, ensaios de inibição de germinação de sementes e crescimentos de raízes demonstram além de possível atividade fitotóxica, efeitos alelopáticos, atividades não apresentadas pelo tirosol (REIGOSA; MALVIDO-PAZOS, 2007).

Em *Candida albicans* o tirosol é reportado como uma molécula sinalizadora de “quorum-sensing”, seu acúmulo induz a expressão de genes envolvidos na replicação de DNA, regulando o crescimento e a morfogênese do fungo (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012) e até o presente momento não há relatos na literatura de que esta substância apresente sinalização de “quorum-sensing” em

outros fungos.

Todas as interações plantas-fungos são precedidas por um encontro físico, seguido por diversas barreiras físicas e químicas que devem ser sobrepujadas para que determinada associação se estabeleça com sucesso (JONES; DANGL, 2006). Fungos endofíticos e patógenos possuem diversos fatores de virulência que são contornados pelos mecanismos de defesa da planta, se a virulência do fungo e a defesa da planta estiverem em equilíbrio a associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta, esta fase é um período transitório no qual fatores ambientais apresentam o papel principal de desestabilizar este delicado balanço de antagonismos. Se os mecanismos de defesa da planta conseguem contornar os fatores de virulência do fungo este irá perecer e se a planta sucumbir aos fatores de virulência do fungo uma relação planta-patógeno levará ao surgimento de sintomas de doenças (SCHULZ; BOYLE, 2005; EATON et al., 2011)

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma das principais defesas de plantas frente a patógenos. Muitos fungos sintetizam manitol, um importante desativador de EROs, evidências sugerem que fungos fitopatógenos utilizam o manitol para suprimir a defesa de plantas mediadas por EROs. Em *Alternaria alternata* foi demonstrada a indução de produção de manitol pelo fungo na presença de extratos de plantas hospedeiras, por sua vez, em plantas não produtoras de manitol foi demonstrado a indução da enzima manitol desidrogenase em resposta a infecção fúngica e por indutores de resposta de defesa de plantas (JENNINGS et al., 1998). Em estudo prévio, o manitol foi também isolado do fungo endofítico *Arthrrium state of Apiospora montagnei* (RAMOS, 2008), assim como o manitol a produção do antioxidante tirosol por fungos fitopatogênicos e endofíticos, pode estar relacionada com os processos de supressão da defesa de plantas por EROs para o estabelecimento da associação fungo-planta.

Em gramíneas, fungos endofíticos produzem e secretam EROs capazes de oxidar e desnaturar membranas celulares de plantas hospedeiras, e desta forma ocasionam o escoamento de nutrientes para o espaço apoplástico facilitando a absorção de nutrientes pelas hifas fúngica. Sugere-se que a produção de EROs por fungos endofíticos resultem na indução da produção de substâncias antioxidantes pelas plantas hospedeiras e a própria produção pelos fungos endofíticos, esta interação seria responsável pelo incremento da tolerância de plantas associadas a

fungos endofíticos a estresses oxidativos (WHITE; TORRES, 2010). Segundo esta hipótese, seria plausível que a produção de tirosol pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* esteja relacionada as interações mutualistas entre o fungo endofítico e a planta.

4.4.4 Substância X – ergosterol

A análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 42) e ^{13}C (Figura 43) bem como comparação com os dados espectroscópicos da literatura permitiu identificar esta substância como sendo o ergosterol, um esteróide comumente isolado de extratos orgânicos obtidos de fungos.

Figura 41. Estrutura química do ergosterol.

Analisando-se o espectro de RMN ^1H (Figura 42) pode-se observar a presença dos sinais relativos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos existentes nesta molécula, que podem ser observados na região entre δ 0,6 e 2,4. A presença de um multipeto em δ 3,63 foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3 (integrado para 1H). Além disto, destacam-se neste espectro os sinais dos hidrogênios olefínicos H-6 (multipeto, δ 5,37, integrado para 1H) e H-7 (duplo-dubeto, δ 5,56, integrado para 1H, J 4-6 = 2,3 Hz e J 6-7 = 5,7 Hz), bem como também o sistema olefínico H-22 e H-23 (multipeto, δ 5,29, integrado para 2H). Os dubletos em δ 1,03 (3H, J 20-21 = 7,0 Hz), 0,92 (3H, J 25-26 = 6,8Hz), 0,82 (3H, J 25-27 = 7,0 Hz) e 0,81 (3H, J 24-28 = 7,0 Hz) e os singletos em δ 0,62 e 0,95 (3H) foram atribuídos respectivamente as metilas H-21, H-26, H-27, H-28, H-18 e H-19.

Pelo espectro de RMN ^{13}C (Figura 42) observa-se a presença de 26 sinais,

podendo-se destacar o carbono carbinólico C-3 (δ 70,5) e os carbonos olefínicos C-5, C-6, C-7, C-8, C-22 e C-23, respectivamente em δ 139,8, 119,6, 116,3, 141,4, 135,6 e 132,0. Os dados de RMN ^{13}C foram comparados com os previamente publicados em literatura (Tabela 6), permitindo assim confirmar a estrutura química da substância X como sendo o ergosterol.

Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz da substância X

Carbono	Ergosterol δ ^{13}C	Substância X δ ^{13}C
C-1	38,3	38,4
C-2	32,0	32,0
C-3	70,4	70,5
C-4	40,8	40,8
C-5	139,8	139,8
C-6	119,6	119,6
C-7	116,3	116,3
C-8	141,3	141,4
C-9	46,2	46,3
C-10	37,0	37,1
C-11	21,1	21,1
C-12	39,1	39,1
C-13	42,8	42,9
C-14	54,5	54,6
C-15	23,0	23,0
C-16	28,2	28,3
C-17	55,7	55,8
C-18	12,0	12,1
C-19	16,2	16,3
C-20	40,4	40,5
C-21	21,1	21,1
C-22	135,5	135,6
C-23	132,0	132,0
C-24	42,8	42,9
C-25	33,1	33,1
C-26	19,9	20,0
C-27	19,6	19,7
C-28	17,6	17,7

* Valores apresentados por Shirane et al. (1996), CDCl_3 , 100 MHz.

Figura 42. Espectro de RMN ^1H da substância X (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C da substância X (CDCl_3 , 100 MHz).

O ergosterol é o principal esteroide presente em membranas de fungos. Crítico não só para biogêneses de membranas plasmáticas e organelas citoplasmáticas fúngicas (ZHANG; RAO, 2010), como para a manutenção de homeostase, por preservar membranas plasmáticas de alterações químicas e físicas (DUPONT et al., 2012), este esteroide, assim como sua via de biossíntese, são uns dos alvos mais efetivos para a terapia antifúngica (KATHIRAVAN et al., 2012), além de serem importantes alvos de fármacos frente aos agentes etiológicos da leishmaniose e doença de Chagas (URBINA, 2009).

Em interações entre plantas e fungos, o reconhecimento de fungos por plantas se dá pela percepção por receptores de moléculas sinais, como o ergosterol, culminado com a ativação de vias de sinalização que induzem respostas de defesas sistêmicas, tanto em interações simbióticas quanto patogênicas (SCHWESSINGER; ZIPFEL, 2008).

Devido ao fato de muitos fungos não serem passíveis de cultivo em condições laboratoriais, tem-se empregado a determinação de concentrações de ergosterol em amostras de plantas e solos como uma forma de se estabelecer a amplitude de colonização por fungos (RICHARDSON; LOGENDRA, 1997; ZHAO et al., 2005; OLSRUD et al., 2007)

Estudos relatam o ergosterol como uma substância bioativa, reportando atividades antitumoral, antiangiogênese (TAKAKU et al., 2001), antioxidante e anti-inflamatória (ZHANG et al., 2002).

Derivados bioativos do ergosterol são amplamente reportados na literatura. Exemplifica-se dentre eles, o peróxido de ergosterol, comumente obtido por foto-oxidação (TRIGOS; ORTEGA-REGULES, 2002), esta substância demonstrou atividade antichagásica ($CI_{50} = 6,74 \mu\text{g/mL}$) frente a *T. cruzi* (RAMOS-LIGONIO et al., 2012) e atividade antileishmania ($CI_{50} = 4,1 \mu\text{g/mL}$) frente formas amastigotas de *L. (V.) panamensis* (CORREA et al., 2006). Outros diversos derivados, tanto obtidos como produtos naturais ou por síntese, apresentam, por exemplo, atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais (WANG et al., 2008; LEE et al., 2008), antienvhecimento (WENG et al., 2010) e anti-HIV (BARRERO et al., 1998).

4.4.5 Substâncias VII e VIII

Através da análise comparativa dos dados espectroscópicos obtidos, demonstrou-se que as substâncias codificadas como VII e VIII correspondem a uma mesma substância, sendo somente reportados os dados de RMN obtidos para a substância VIII. A substância VIII (Figura 44) trata-se de um derivado do ergosterol, cuja estrutura química foi proposta com base na análise dos espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H), bem como comparação de dados espectroscópicos de substâncias correlatas previamente publicadas na literatura (SIMON et al., 2007; WANG et al., 2008).

Figura 44. Estrutura química da substância VIII (VII).

Analisando-se o espectro de RMN ^1H (Figura 45) pode-se observar a presença dos sinais relativos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos existentes nesta molécula, que podem ser observados principalmente na região entre δ 0,8 e 2,4. Neste espectro, destacam-se os hidrogênios das metilas H-26 (δ 0,84, *d*, $J=6,8$ Hz), H-27 (δ 0,87, *d*, $J=6,8$ Hz), H-21 (δ 1,2, *s*), H-28 (δ 1,28, *s*), H-18 (δ 1,43, *s*) e H-19 (δ 1,47, *s*), com multiplicidades e deslocamentos químicos característicos deste tipo de núcleo esteroidal. Nesta análise é possível observar também a presença de um hidrogênio olefínico atribuído ao H-6 (singleto, integrado para 1H), que devido ao fato de estar conjugado com um grupamento carbonila apresenta um deslocamento químico em δ 6,54. Correlações a longa distância de H-

6 com três carbonos quaternários em δ 106,8 (C-8), δ 135,1 (C-5) e δ 153,3 (C-9) (Figura 47), bem como comparação de dados espectroscópicos presentes na literatura de estruturas químicas correlatas (WANG et al., 2008), nos permitiu propor para esta substância um grupamento carbonílico conjugado com duas duplas ligações no anel B deste esteroide.

Figura 47. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação do hidrogênio H-6 com os carbonos C-5, C-8 e C-9 (CDCl₃, 600 MHz).

A análise do espectro de RMN ¹³C (Figura 46) demonstrou a existência, além dos carbonos olefínicos C-5, C-8 e C-9 e do carbono carbonílico C-7 (δ 195,5), a presença de mais dois carbonos quaternários do tipo sp² e de um grupamento cetona, os quais foram atribuídos com auxílio do espectro de HMBC aos carbonos C-15 (δ 208,9), C-16 (δ 143,8) e C-17 (δ 139,9). A presença da ligação dupla entre os carbonos C-16/C-17 foi confirmada pela correlação entre os hidrogênios da metila H-21 (δ 1,2) com o carbono C-17 (δ 139,9), como pode ser observado na figura 48. Por sua vez, o efeito anisotrópico promovido pelos grupamentos carbonílicos no hidrogênio H-14, ocasiona um efeito de desblindagem neste núcleo, sendo observado seu sinal no espectro de RMN ¹H como um singlete em δ 3,45 (integrando para 1H) e que apresenta correlação no espectro de HMBC com dois carbonos carbonílicos (Figura 49).

Figura 48. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre os hidrogênios do grupo metila H-21 com o carbono C-17 em δ 139,9 (CDCl₃, 600 MHz).

Figura 49. Mapas de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre o hidrogênio H-14 (δ 3,45) com os carbonos carbonílicos em δ 195,5 e 208,9 (CDCl₃, 600 MHz).

O espectro de RMN ^1H possui também a presença de um singlete em δ 10,6 (integrando para 1H), o qual é característico de hidrogênios de grupos OH inseridos em duplas ligações e que apresentam em seu ambiente espacial funções orgânicas capazes de realizar pontes de hidrogênio (ASHA et al., 2004), o que permite a conclusão da existência de uma hidroxila ligada ao carbono C-16 da presente proposta estrutural.

A análise do espectro de RMN ^{13}C demonstra ainda, que na estrutura química da substância VIII, existe a presença de 5 carbonos carbinólicos que podem ser observados no espectro em δ 71,8, 80,5, 83,1, 83,6 e 85,9. Pela análise do espectro de HMQC foi possível verificar que somente os carbonos em δ 80,5, 83,6 e 85,9 apresentam correlação com sinais de hidrogênio (Figura 50), sendo possível concluir que os carbonos em δ 71,8 e 83,1 são quaternários. Essa informação foi confirmada também pelo espectro de DEPT 135, onde os sinais referentes a estes carbonos não são passíveis de observação no espectro (Figura 51).

Figura 50. Mapa de contornos HMQC da substância VIII. Correlação entre os carbonos carbinólicos em δ 80,5, 83,6, e 85,9 com seus respectivos sinais de hidrogênio (CDCl_3 , 400 MHz)..

Figura 51. Espectro de DEPT 135 da substância VIII. Demonstração de que os carbonos carbinólicos em δ 71,8 e 83,1 são quaternários (CDCl_3 , 100 MHz).

Com relação aos hidrogênios carbinólicos existentes nesta substância, é possível observar, pelo espectro de RMN ^1H , que estes hidrogênios se apresentam como três duplo-dupletos, integrados para 1H cada, em δ 5,05 ($J=5,3, 7,8$ Hz), 3,51 ($J=3,3, 7,8$ Hz) e 3,25 ($J=5,5, 11,6$ Hz). Com auxílio do espectro de HMQC foram atribuídos aos respectivos sinais de carbono δ 80,5, 85,9 e 83,6, conforme pode ser observado na Figura 50. Pela análise do espectro de HMBC é possível observar também a correlação entre os hidrogênios das metilas H-18 e H-19 com o carbono carbinólico em δ 83,6 (Figura 52), o que sugere que este grupamento está inserido nesta molécula no carbono C-11. A estereoquímica deste grupo funcional foi proposta em α , uma vez que, somente nesta posição espacial seria possível observar duas constantes de acoplamento com valores completamente distintos ($J=5,5, 11,6$ Hz).

O hidrogênio cujo sinal é evidenciado em δ 5,05, no espectro de RMN ^1H , apresenta correlações no espectro de HMBC com um carbono carbonílico em δ 170,9 (deslocamento químico característico de grupo éster) e com o carbono C-17 (δ 139,9). Neste mesmo espectro, é possível verificar que o singlete em δ 2,06 (integrado para 3H) observado no espectro de RMN ^1H correlaciona-se também com o carbono carbonílico em δ 170,9 (Figura 53). Todas estas informações permitem concluir que esta molécula possui um grupamento acetóxi inserido no carbono C-22.

Figura 52. Mapa de contornos HMBC da substância VIII. Correlação entre os hidrogênios metílicos H-18 e H-19 com o carbono carbinólico em δ 83,6 (CDCl_3 , 600 MHz).

Figura 53. Espectro de HMBC mostrando a correlação entre o hidrogênio H-22 (δ 5,05) com o carbono C-29 (δ 170,9) e com o carbono C-17 (δ 139,9). Nesta região do espectro verifica-se também a correlação dos hidrogênios da metila H-30 (δ 2,06) com o carbono C-29.

Finalmente, o hidrogênio carbinólico cujo sinal aparece no espectro em δ 3,51 apresenta correlação no espectro de HMBC com os carbonos C-5 (δ 135,1) e C-6 (δ 108,9), o que sugere a presença de uma hidroxila inserida no carbono C-4. Devido aos valores das constantes de acoplamento observados para o hidrogênio H-4 (δ

3,51, *dd*, $J=3,3$, 7,8 Hz) foi possível propor que este grupo funcional está inserido com uma estereoquímica relativa em β .

É importante salientar que experimentos de NOE e determinação da massa molecular desta substância em equipamento de alta resolução estão sendo obtidos, com a finalidade de confirmar a proposta estrutural da substância VIII (VII), bem como, determinar inequivocamente a estereoquímica relativa dos grupos OH.

Tabela 7 - Dados de RMN ^{13}C e ^1H em CDCl_3 , da substância VIII

C/H	$\delta^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (400 MHz)	Mult J (Hz)
1	36,8		
2	24,3		
3	29,7		
4	35,9	3,51	<i>dd</i> , 3,3 ;7,8
5	135,1		
6	108,9	6,54	<i>s</i>
7	195,5		
8	106,8		
9	153,3		
10	36,5		
11	83,6	3,25	<i>dd</i> , 5,5;11,6
12	38,9	3,14	<i>dd</i> , 11,6;12,5
13	18,8		
14	53,4	3,45	<i>s</i>
15	208,9		
16	143,8		
17	139,9		
18	12,6	1,43	<i>s</i>
19	21,8	1,47	<i>s</i>
20	71,8		
21	24,1	1,2	<i>s</i>
22	80,5	5,05	<i>dd</i> , 5,3;7,8
23	34,5	3,56	<i>dd</i> , 5,5;7,2
24	83,1		
25	51,4		
26	11,1	0,84	<i>d</i> , 6,8
27	15,3	0,87	<i>d</i> , 6,8
28	26,4	1,28	<i>s</i>
29	170,9		
OH-16		10,6	<i>s</i>
Me-30	20,1	2,06	<i>s</i>

Figura 45. Espectro de RMN ^1H da substância VIII (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C da substância VIII (CDCl_3 , 100 MHz).

4.4.6 Substâncias IX e IV

Através da análise comparativa dos dados espectroscópicos obtidos, demonstrou-se que as substâncias codificadas como IV e IX correspondem a uma mesma substância, sendo somente reportados os dados de RMN obtidos para a substância IX. A substância IX (Figura 54), como observado pela análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 55) e ^{13}C (Figura 56) apresenta uma estrutura química muito semelhante àquela proposta para o metabólito VIII, onde a principal modificação observada é a redução do grupamento cetona inserido no carbono C-15 para um grupo funcional álcool. A estrutura química da substância IX foi proposta com base na análise dos espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H), bem como comparação dos dados espectroscópicos da substância VIII.

Figura 54. Estrutura química da substância IX (IV).

Do mesmo modo que a substância VIII observa-se no espectro de RMN ^1H a presença dos sinais relativos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos existentes nesta molécula, podendo se destacar os sinais dos hidrogênios das metilas H-26 (δ 0,84, *d*, $J=7,3$ Hz), H-27 (δ 0,86, *d*, $J=7,3$ Hz), H-21 (δ 1,17, *s*), H-28 (δ 1,20, *s*) e H-19 (δ 1,48, *s*), fundamentais para a caracterização do núcleo derivado do ergosterol. Diferentemente da substância VIII, o sinal referente aos hidrogênios

da metila H-18 (1,20, s) sofreu um efeito de blindagem. Esta diferença significativa de deslocamento químico (0,23 ppm) pode ser atribuído à ausência do efeito anisotrópico produzido pelos elétrons da dupla ligação do grupamento cetona inserido no carbono C-15 em função de sua redução a um grupamento álcool.

Além dos hidrogênios metílicos anteriormente apresentados, no espectro de RMN ^1H desta substância, como também observado para a substância VIII, é possível verificar a presença dos hidrogênios carbinólicos H-4 (δ 3,62, $J=2,5, 7,8$ Hz) e H-11 (δ 3,73, $J= 4,0, 11.8$), que com auxílio do espectro de HMQC (Figura 57) foram atribuídos aos carbonos em δ 79,3 (C-4) e 75,4 (C-11), respectivamente. Estes hidrogênios foram atribuídos em função da correlação observada no espectro de HMBC entre os hidrogênios da metila H-19 (δ 1,48, s) com o carbono em δ 75,4 (Figura 58). Os valores das constantes de acoplamento destes hidrogênios nos permitiram propor a estereoquímica relativa em β e α , respectivamente, para as hidroxilas OH-4 e OH-11, do mesmo modo como atribuído para a substância VIII.

Figura 58. Espectro de HMBC mostrando a correlação entre os hidrogênios da metila H-19 com o carbono em δ 75,4.

O espectro de HMBC (Figura 59) revela também que o singlete em δ 2,04 (integrado para 3H) apresenta uma forte correlação com o carbono em δ 170,8 (grupamento carbonila de ésteres), nos permitindo concluir que nesta molécula existe também um grupamento acetóxi inserido no carbono C-22 desta substância, como observado para a substância VIII. Neste espectro (Figura 59) é possível verificar também que o duplo dubleto em δ 5,04 ($J=5,7, 7,4$ Hz) apresenta correlação com o carbono em δ 170,8, permitindo atribuir este sinal ao hidrogênio H-22.

Figura 59. Espectro de HMBC demonstrando a correlação dos sinais em δ 2,04 e 5,04 com a carbonila do éster do grupamento acetóxi (δ 170,8).

O grupo funcional cetona conjugado com as duas duplas ligações entre o carbono C-5/C-6 e C-8/C9 presentes no anel B do núcleo esteroidal foi também proposto para a substância IX, onde os sinais referentes aos hidrogênios H-6 (δ 6,54, s) e H-14 (δ 3,50, singlete largo) podem ser verificados. No espectro de RMN ^1H desta substância, diferentemente dos sinais observados para a VIII, existe a presença de um dubleto em δ 4,74 ($J = 1,3$ Hz) associado ao carbono em δ 69,9, de acordo com o espectro de HMQC, e que foi atribuído ao hidrogênio H-15, em função da redução do grupo cetona presente em VIII. A estereoquímica relativa do grupo OH no carbono 15 foi proposta em β , uma vez que, somente nesta posição espacial

o ângulo diedro entre os hidrogênios H-14 e H-15 é próximo dos 90°, originando assim uma constante de acoplamento pequena.

É importante salientar que experimentos de NOE e determinação da massa molecular desta substância em equipamento de alta resolução estão sendo obtidos, com a finalidade de confirmar a proposta estrutural da substância VIII, bem como, determinar inequivocamente a estereoquímica relativa dos grupos OH.

Tabela 8 - Dados de RMN ^{13}C e ^1H em CDCl_3 , da substância IX

C/H	$\delta^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (400 MHz)	Mult <i>J</i> (Hz)
1	36,8		
2	24,7		
3	29,5		
4	79,3	3,62	dd, 2,5 ;7,8
5	135		
6	108,2	6,54	s
7	199,3		
8	106,8		
9	153,3		
10	36,4		
11	75,4	3,73	dd, 4,0;11,8
12	38,9	3,14	dd, 11,6;12,5
13	18,1		
14	53,3	3,50	s
15	69,9	4,74	d,1,3
16	143,8		
17	139,9		
18	12,6	1,20	s
19	21,8	1,48	s
20	71,8		
21	24,1	1,17	s
22	80,5	5,04	dd, 5,7;7,4
23	34,5	3,56	dd, 5,5;7,2
24	83,1		
25	51,4		
26	11,1	0,84	d, 7,3
27	15,3	0,86	d, 7,3
28	26,4	1,20	s
29	170,8		
Me-30	20,9	2,04	s

Figura 55. Espectro de RMN de ^1H da substância IX (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C da substância IX (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura 57. Mapa de contornos HMQC da substância IX (CDCl_3 , 400 MHz).

4.5 Atividade esquistossomícida

Com o intuito de avaliar a seletividade para a atividade antileishmania dentre as substâncias bioativas isoladas, e a presença de atividade antiparasitária das substâncias que apresentaram-se inativas em ensaios antileishmania, as substâncias isoladas do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* foram avaliadas em ensaios de atividade esquistossomícida.

As substâncias que apresentaram atividade antileishmania, substâncias VIII (VII) e IX (IV) (tabela 14), não apresentaram atividade esquistossomícida nas concentrações avaliadas (12,5 – 50 µg/ml). No entanto, quando os parasitas foram incubados com estas substâncias em 50 µg/mL, foi observada redução significativa de atividade motora em 100% dos parasitas após 120 horas de incubação (tabela 10). Estes resultados sugerem que em maiores concentrações, estas substâncias, possam apresentar atividade esquistossomícida.

As substâncias I e III, que apresentaram-se inativas nos ensaios antileishmania, causaram 100% de morte de casais de *S. mansoni* quando avaliadas nas concentrações de 200 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. De acordo com a atividade esquistossomícida apresentada, estas substâncias foram avaliadas quanto a atividade de separação de casais. A substância III não alterou o pareamento dos parasitas, porém, a substância I, mesmo apresentando atividade esquistossomícida em 200 µg/mL, na concentração subletal de 50 µg/mL causou 100% de separação dos casais, após 120 horas de incubação (Figuras 60 e 61).

A redução do pareamento dos casais de *Schistosoma* sp. afeta diretamente a capacidade de ovoposição das fêmeas, substâncias que apresentem esta atividade podem potencialmente, em infecções por *Schistosoma* sp., diminuir a parasitemia presente.

Figura 60. Efeito da substância I no pareamento de casais de *S. mansoni*

Figura 61. Efeito da substância III no pareamento de casais de *S. mansoni*

Tabela 9. Efeito *in vitro* das substâncias I - III frente *S. mansoni*

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)	% de casais mortos	% de redução de atividade motora	
				pouco significativa	significativa
I	50	24	0	0	0
		72	0	75	0
		120	0	50	25
	100	24	0	0	0
		72	0	75	0
		120	25	25	50
	200	24	0	25	0
		72	0	25	75
		120	100	0	0
II (VI)	25	24	0	0	0
		72	0	0	0
		120	0	50	0
	50	24	0	0	0
		72	0	0	0
		120	0	50	0
	100	24	0	0	0
		72	0	75	0
		120	0	25	50
III	12,5	24	0	25	25
		72	0	50	50
		120	50	25	25
	25	24	0	25	25
		72	0	25	75
		120	50	25	25
	50	24	0	25	75
		72	0	25	75
		120	100	0	0

Tabela 10. Efeito *in vitro* das substâncias V e IX frente *S. mansoni*

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)	% de casais mortos	% de redução de atividade motora	
				pouco significativa	significativa
V	12,5	24	0	0	0
		72	0	0	0
		120	0	50	0
	25	24	0	0	0
		72	0	0	0
		120	0	75	0
	50	24	0	50	0
		72	0	50	0
		120	0	75	0
VIII (VII)	12,5	24	0	0	0
		72	0	0	0
		120	0	0	0
	25	24	0	0	0
		72	0	50	0
		120	0	50	0
	50	24	0	75	0
		72	0	75	0
		120	0	25	75
IX (IV)	12,5	24	0	25	0
		72	0	50	0
		120	0	25	50
	25	24	0	25	50
		72	0	25	50
		120	0	25	75
	50	24	0	25	50
		72	0	25	50
		120	0	0	100

Tabela 11. Efeito *in vitro* das substância X e controles frente *S. mansoni*

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)	% de casais mortos	% de redução de atividade motora	
				pouco significativa	significativa
X	12,5	24	0	25	0
		72	0	25	0
		120	0	100	0
	25	24	0	25	50
		72	0	25	50
		120	0	50	50
	50	24	0	0	100
		72	0	0	100
		120	0	0	100
Controle positivo (praziquante)	12,5	24	100	0	0
		120	100	0	0
Controle negativo	DMSO (0,1%)	24	0	0	0
		120	0	0	0

Devido a atividade esquistossomicida apresentada e a disponibilidade de massa da substância I, avaliou-se seu efeito na alteração tegumentar de *S. mansoni*. Submetidos a concentração letal da substância I (200 µg/mL), os parasitas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Com esta técnica foi possível observar alterações intensas no tegumento, como erosão da superfície tegumentar e presença de tubérculos deformados, com deterioração de seus espinhos, ruptura do tegumento e colapso dos tubérculos, além de danos nas ventosas oral e ventral (Figuras 62-74).

O tegumento de *Schistosoma* sp. é um importante alvo para drogas, formado por um único sincício citoplasmático que recobre todo o corpo do parasita, é uma camada dinâmica de interação com o hospedeiro, envolvida na nutrição, evasão e modulação do sistema imune do hospedeiro, excreção, osmorregulação, percepção

sensorial e transdução de sinais. Danos ao tegumento destes parasitas tem grande implicância no desempenho de suas funções vitais (FAGHIRI et al., 2010; MULVENNA et al., 2010).

O praziquantel, principal fármaco utilizado no tratamento da esquistossomose, ocasiona danos extensivos ao tegumento de parasitas adultos de *Schistosoma* sp., estas alterações são críticas para a atividade esquistossomicida deste fármaco, pois propicia a exposição de antígenos do parasita permitindo uma resposta imune mais efetiva do hospedeiro (GNANASEKAR et al., 2009). Assim como o praziquantel, principal fármaco utilizado no tratamento da esquistossomose, as análises ultraestruturais de *Schistosoma mansoni* sugerem, *in vitro*, que o tegumento é o principal alvo da substância I. Possivelmente, alterações morfológicas no tegumento do parasita são o principal mecanismo de ação da *R*-(-)-meleina (substância I) e provavelmente da *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina (substância III), devido as similaridades estruturais entre estas substâncias. É interessante ressaltar que a substância I ocasionou danos nas ventosas oral e ventral dos parasitas, danos em ventosas resultam na perda da habilidade dos parasitas de aderirem a veias sanguíneas, dificultando a ingestão de nutrientes provenientes do sangue do hospedeiro e potencialmente, *in vivo*, resultam na diminuição de parasitemia (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2005). Sugerem-se assim, as substâncias I e III como promissoras para o desenvolvimento de fármacos com atividade esquistossomicida.

Até o presente momento não há relatos na literatura sobre a atividade esquistossomicida das substâncias *R*-(-)-meleina (substância I) e da *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina (substância III).

Figura 62. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com controle negativo. 400 e 1000 X.

Figura 63. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com controle positivo. 60 X.

Figura 64. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com controle positivo. Acúmulo de bolhas ou zeiosis na superfície, indicativo de danos ao tegumento. 1000 X.

Figura 65. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com controle positivo. Erosão da superfície tegumentar e presença de tubérculos deformados com deterioração dos espinhos. 1000 X.

Figura 66. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Danos ao tegumento por toda a extensão do parasita. 70 X.

Figura 67. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Erosão da superfície tegumentar. 200 X.

Figura 68. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Erosão da superfície tegumentar e presença de tubérculos deformados com deterioração dos espinhos 100 X.

Figura 69. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Danos ao tegumento por toda a extensão do parasita e alterações nas ventosas oral e ventral. 60 X.

Figura 70. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Ruptura do tegumento e colapso dos tubérculos. 200 X.

Figura 71. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Ruptura do tegumento e colapso dos tubérculos. 500 X.

Figura 72. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Ruptura do tegumento e colapso dos tubérculos. 1000 X.

Figura 73. Eletromicrografia de fêmea de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. 200 X.

Figura 74. Eletromicrografia de *S. mansoni* submetido ao tratamento com a substância I. Erosão tegumentar. 1000 X.

4.6 Atividade antileishmania

A atividade observada para o extrato AAM frente à *Leishmania major* (4,87 µg/mL) divergiu do resultado previamente obtido (2,97 µg/mL) pelo autor deste estudo. Esta divergência pode ser resultante de modificações efetuadas no protocolo de avaliação da atividade antileishmania, bem como devido a possíveis variações nos processos de obtenção do extrato ou mesmo no nível de produção de metabólitos secundários bioativos pelo fungo endofítico em estudo.

As frações provenientes do fracionamento de AAM, por cromatografia líquida a vácuo, foram submetidas a avaliação de atividade antileishmania (Tabela 12). A maior atividade foi detectada na fração AAM.5, seguida pelas frações AAM.4 e AAM.6, respectivamente. Não foi possível determinar a CI_{50} da fração AAM.7, pois esta apresentou ponto de corte definido, devido ao intervalo de concentrações avaliadas (0,0781-40µg/mL), sendo reportado a concentração inibitória total para esta fração. A substância I, assim como a fração da qual é proveniente, AAM.2, não apresentou atividade.

Tabela 12. Atividade antileishmania frente *L. major*

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)
AAM	4,87
AAM-1	-
AAM-2	-
AAM-3	19,78
AAM-4	4,8
AAM-5	0,815
AAM-6	7,16
AAM-7	40*
Substância I	-
Controle Positivo (G418)	0,427

(-) Ausência de atividade. * 100% de inibição, não foi possível determinar CI₅₀.

Com o intuito de direcionar os procedimentos de purificação de substâncias, as subfrações que apresentaram massa relevante, bem como perfis cromatográficos por CCDC e CLAE promissores (dados não apresentados), foram submetidas a avaliação de atividade antileishmania (Tabela 13), permitindo o isolamento de substâncias de frações notadamente bioativas. Desta forma, isolou-se da subfração AAM.3.4, a substância V (Figura 14), da subfração AAM.4.4.4 as substâncias III e IV (Figura 16), da subfração AAM.4.8 as substâncias II e VI (Figuras 16 e 17) e da subfração AAM.5.5 as substâncias VII, VIII e IX (Figura 20). Contudo, as substâncias II, VI, III e V não apresentaram atividade antileishmania ($CI_{50} \leq 40 \mu\text{g/mL}$) mesmo sendo provenientes de subfrações previamente identificadas como bioativas. Entretanto, o fracionamento bioguiado das frações e subfrações que apresentaram as melhores atividades (AAM.5, AAM.5.5), propiciou o isolamento de duas substâncias com elevada atividade antileishmania (substâncias VIII e IX).

Tabela 13. Determinação da CI₅₀ (µg/mL) de frações frente a diferentes espécies de *Leishmania*

Amostras	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>
AAM-3.4	20,31	15,96
AAM-4.4	5,603	9,593
AAM-4.4.4	2,573	16,57
AAM-4.8	3,638	13,56
AAM-5.5	4,024	4,152
AAM-7.4	30,16	32,72
G418	5,184	2,787
Higromicina	2,066	1,342

Tabela 14. Determinação da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de substâncias frente a diferentes espécies de *Leishmania*

Substâncias	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>
I	-	-
II (VI)	-	-
III	-	-
IV	7,139	6,52
V	-	-
VII	12,54	8,788
VIII	15,73	13,26
IX	3,047	2,873
Anfotericina B	0,1519	0,084
Controle Negativo	-	-

Há poucos relatos de metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes de fungos endofíticos. O extrato bruto do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. quando avaliado em 20 $\mu\text{g/mL}$, apresentou 87% de morte nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/196/PH-8). As substâncias isoladas deste extrato, cochlioquinona A e isocochlioquinona A apresentaram CI_{50} de 1,7 e 4,1 μM , respectivamente (CAMPOS et al., 2008).

Isolada do fungo endofítico *Mycosphaerella* sp., a cercosporina apresentou frente a *Leishmania donovani* CI_{50} de 0,46 μM (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011) e a substância citrinina, produzida pelo fungo endofítico *Penicillium janthinellum*, causou 100% de morte de *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) quando avaliadas em 40 $\mu\text{g/mL}$ (MARINHO et al., 2005).

O extrato bruto do fungo endofítico *Edenia* sp. apresentou frente a formas amastigotas de *Leishmania donovani* (LD-1S/MHOM/SD/00-strain 1S) CI_{50} de 0,14 $\mu\text{g/mL}$. Através do fracionamento bioguiado deste extrato bruto, sete substâncias foram isoladas e apresentaram valores de CI_{50} que variaram entre 0,12 e 33,4 μM , dentre as quais a 5-metilocracina, também conhecida por 5-metilmeleina, que apresentou CI_{50} de 33,4 μM (MARTÍNEZ-LUÍS et al., 2008; MARTÍNEZ-LUÍS et al., 2009). Nos ensaios antileishmania efetuados neste trabalho, tanto a *cis*-(3*R*,4*R*)-4-hidroximeleina (substância III) quanto a *R*-(-)-meleina (substância I) apresentaram-se inativas, desta forma, sugere-se que a presença do grupo metila na posição 5' confere a atividade antileishmania reportada para a 5-metilmeleina.

A substância II (VI), identificada como tirosol, não apresentou atividade antileishmania nas concentrações testadas frente às espécies avaliadas. Este resultado encontra-se em concordância com a literatura, na qual o tirosol foi avaliado

quanto sua atividade antileishmania frente a formas promastigotas de *L. major* (MHOM/TN/95/GLC94) e *L. infantum* (MHOM/TN/94/LV50), apresentando-se inativo ($CI_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$), contudo, ésteres lipofílicos derivados do tirosol como o tirosil caprilato, tirosil capriato e tirosil laurato apresentaram atividade antileishmania promissora com valores de CI_{50} de 19,21 a 157,6 $\mu\text{g/ml}$ para as mesmas espécies de *Leishmania* (AISSA et al., 2012).

O ergosterol, substância X, não foi avaliado nos ensaios de atividade antileishmania por ter sido isolado posteriormente a sua realização. Não foram encontrados relatos na literatura que reportem a avaliação do ergosterol em ensaios antileishmania. Contudo, o peróxido de ergosterol, um derivado do ergosterol, demonstrou atividade antichagásica ($CI_{50} = 6,74 \mu\text{g/mL}$) frente a *T. cruzi* (RAMOS-LIGONIO et al., 2012) e atividade antileishmania ($CI_{50} = 4,1 \mu\text{g/mL}$) frente formas amastigotas de *L. (V.) panamensis* (CORREA et al., 2006).

A substância IX apresentou a atividade antileishmania mais significativa, CI_{50} de 3,047 $\mu\text{g/mL}$ para *L. braziliensis* e CI_{50} de 2,873 $\mu\text{g/mL}$ para *L. chagasi*, dentre as duas substâncias isoladas que demonstraram atividade (Tabela 14). De acordo com as propostas estruturais estabelecidas para estas substâncias, não foram obtidos resultados em buscas efetuadas no banco de dados SciFinder Scholar®, sugerindo que ambas as substâncias são inéditas na literatura. É interessante salientar que inversamente às substâncias I e III, que demonstraram atividade relevante nos ensaios de atividade frente a *S. mansoni* e foram inativas quanto à atividade antileishmania, as substâncias IX (IV) e VIII (VII) não apresentaram atividade nos ensaios frente a *S. mansoni*, o que sugere que estas substâncias possuam possível seletividade para a atividade antileishmania detectadas.

Demonstra-se assim, o fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. como promissor na produção de novos metabólitos secundários com atividade antileishmania. Estes dados corroboram também, fungos endofíticos como uma fonte promissora, ainda pouco explorada, de novos metabólitos com atividade antileishmania.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- Observaram-se variações de rendimento nos extratos obtidos de diferentes cultivos do fungo *Arthrinium* state of *Apiospora Montagnei* Sacc., que podem ser resultantes de variações no nível de produção de metabólitos secundários ou decorrente dos processos de obtenção dos extratos.
- Mesmo apresentando estas variações, os diferentes cultivos apresentaram em seus extratos, perfil cromatográfico semelhante, sugerindo uniformidade na produção de metabólitos secundários por esse fungo endofítico.
- Foram isoladas 10 substâncias produzidas pelo fungo *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc., das quais 8 foram provenientes de frações bioativas.
- As substâncias I e III apresentaram atividade esquistossomicida, causando 100% de morte dos parasitas quando avaliadas nas concentrações de 200 e 50 µg/mL, respectivamente. Análises por microscopia eletrônica de varredura sugeriram as alterações morfológicas observadas, erosão da superfície tegumentar e presença de tubérculos deformados com deterioração dos espinhos e ruptura do tegumento e colapso dos tubérculos, como o possível mecanismo de ação destas substâncias.
- As substâncias VIII e IX apresentaram atividade antileishmania relevante, com valores de CI_{50} de 7,13, 12,54, 15,73 e 3,04 µg/mL frente *Leishmania braziliensis* e 8,78 e 2,87 µg/mL frente *L. chagasi*, respectivamente. Estas substâncias parecem ser inéditas na literatura.
- O presente trabalho corrobora fungos endofíticos como uma fonte promissora, ainda pouco explorada, de novos metabólitos com atividade antileishmania e esquistossomicida.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, V. K.; SINGH, B. Z. Miltefosine: First oral drug for treatment of visceral leishmaniasis. **Medical Journal Armed Forces India**, v.62, p.66-67, 2006.

AGUILAR, C. M.; FERNÁNDES, E.; FERNÁNDES, R.; CANNOVA, D. C.; FERRER, E. CABRERA, Z.; SOUZA, W. J. S.; COUTINHO, S. G. Urban visceral leishmaniasis in venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.15-16, 1998.

AISSA, I.; SGHAIR, R. M.; BOUAZIZ, M.; LAOUINI, D.; SAYADI, S.; GARGOURI. Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities. **Lipids in Health and Disease**, v.11, n.1, p.13, 2012.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi-a review. **Medical Mycology**, v.50, n.4, p.337-345, 2012.

ALFATAFTA, A. A.; GLOER, J. B. Apiosporamide, a new antifungal agent from the coprophilus fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v.57, p.1696-1702, 1994.

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; BOER, M. D.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; HORST, R. T.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J. The relationship between Leishmaniasis and Aids: the second ten years. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, p.334-359, 2008.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanol. **Micopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.6, p.1829-1845, 2011.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; SILVA, M. VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; THIEMANN, O. H.; SILVA, M. F. G. F.; OLIVA, G. Screening of Leishmania APRT enzyme inhibitors. **Pharmazie**, v.60, p.781-784, 2005.

ARAÚJO, F. D. S.; FÁVARO, L. C. L.; ARAÚJO, W. L.; OLIVEIRA, F. L.; APARICIO, R.; MARSAIOLI, A. J. Epicolactone - Natural Product Isolated from the Sugarcane

Endophytic Fungus *Epicoccum nigrum*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 27, p. 5225–5230, 2012.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p.15649-15654, 2003.

ASHA, K.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C.; RASHID, M. Steroids and polyketides from *Uvaria hamiltonii* stem bark. **Acta Pharmaceutica**, v.54, p.57–63, 2004.

ATTYGALLE, A. B.; SIEGEL, B.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J.; MASCHWITZ, U. Chemical composition and function of metapleural gland secretion of the ant, *Crematogaster deformis* Smith (Hymenoptera: Myrmicinae). **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.1, p.317–328, 1989.

BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; POYATOS, J. A.; JIMÉNES, D.; OLIVER, E. Phycomysterols and Other Sterols from the Fungus *Phycomyces blakesleeanus*. **Journal of Natural Products**, v.61, n.3, p.1491–1496, 1998.

BATTISTA, J. P.; BACON, C. W.; SEVERSON, R.; PLATTNER, R. D.; BOUTON, J. H. Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. **Agronomy Journal**, v.82, p.878-880, 1990.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; RODRÍGUES-PALENZULA, P.; GARCÍA-OLMEDO, F.; RIVAS, L. *Leishmania donovani*: Thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **Experimental Parasitology**, v.122, p.247–249, 2009.

BLUM, M. S.; MOREL, L.; FALES, H. M. Chemistry of the mandibular gland secretion of the ant *Camponotus vagus*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.86, n.2, p.251–252, 1987.

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

BOTELHO-MACHADO, C.; CABRAL, F. J.; SOARES, C. S.; MOREIRA, E. B. C.; MORAIS, E. R.; MAGALHÃES, L. G.; GOMES, M. S.; GUERRA-SÁ, R.; ROSA, J. C.; RULLER, R.; WARD, R. J.; RODRIGUES, V. Characterization and mRNA expression analysis of PI31, an endogenous proteasome inhibitor from *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v.107, n.5, p.1163–1171, 2010.

BROPHY, J. J.; CAVILL, G. W. K.; PLANT, W. D. Volatile constituents of an Australian ponerine ant *Rhytidoponera metallica*. **Insect Biochemistry**, v.11, n.3, p.307–310, 1981.

CABELLO, M. A.; PLATAS, G.; COLLADO, J.; DíEZ, M. T.; MARTÍN, I.; VICENTE, F.; MEINZ, M.; ONISHI, J. C.; DOUGLAS, C.; THOMPSON, J.; KURTZ, M. B.; SCHWARTZ, R. E.; BILLS, G. F.; GIACOBBE, R. A.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; PELÁEZ F. Arundifungin, a novel antifungal compound produced by fungi: biological activity and taxonomy of the producing organisms. **International Microbiology**, v.4, p.93-102, 2001.

CABRAS, A.; MANNONI, M. A.; SERRA, S.; ANDOLFI, A.; FIORE, M.; EVIDENTE, A. Occurrence, isolation and biological activity of phytotoxic metabolites produced in vitro by *Sphaeropsis sapinea*, pathogenic fungus of *Pinus radiata*. **European Journal of Plant Pathology**, v.115, p.187–193, 2006.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; TELES RABELLO, A. L.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.12, p.e348, 2008.

CAÑUELO, A.; GILBERT-LÓPEZ, B.; PACHECO-LIÑÁN, P.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; MIRANDA-VIZUETE, A. Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.133, n.8, p.563–574, 2012.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.14, p.5048–5052, 2004.

CHEN, Q.; YANG, L.; ZHANG, G.; WANG, F. Bioactivity-guided Isolation of Antiosteoporotic Compounds from *Ligustrum lucidum*. **Phytotherapy Research**, doi: 10.1002/ptr.4820, 2012.

CHENG, M. J.; WU, M. D.; YUAN, G. F.; CHEN, Y. L.; SU, Y. S.; HSIEH, M. T.; CHEN, I. S. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic fungus *Annulohypoxylon squamulosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 219–223, 2012.

CHONG, L. M.; SHERIDAN, J. E. Mycoflora of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v.20, p.187-189, 1982.

CHLEBICKI, A. Some endophytes of *Juncus trifidus* from Tatra Mts. in Poland. **Acta Mycologica**, v.44, n.1, p.11–17, 2009.

COELHO A. C.; TOSI, L. R. O.; COTRIN, P. C. Mapping of a *Leishmania major* gene/locus that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p.109-112, 2004.

CORREA, E.; CARDONA, D.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; FRANCO, A. E.; VÉLEZ, I. D.; ROBLEDO, S.; ECHEVERRI, F. Leishmanicidal activity of *Pycnopus sanguineus*. **Phytotherapy Research**, v.20, n.6 p.497-499, 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p.502–508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.111–126, 2006.

CRUZ, A. K.; TOLEDO, J. S.; FALADE, M. TERRÃO, M. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; KYLE, D. E.; UTHAIPIBULL, C. Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. **Current Drug Targets**, v.10, p.178–192, 2009.

CUEVA, C.; MINGO, S.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; BUSTOS, I.; REQUENA, T.; CAMPO, R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.54, n.6, p.557–563, 2012.

CUNHA, N. L.; UCHÔA, C. J. D. M.; CINTRA, L. S.; SOUZA, H. C.; PEIXOTO, J. A.; SILVA, C. P.; MAGALHÃES, L. G.; GIMENEZ, V. M. M.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; SILVA-FILHO, A. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H. In vitro schistosomicidal activity of some brazilian cerrado species and their isolated compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.ID173614, 2012.

DAI, J. R.; CARTÉ, B. K.; SIDEBOTTOM, P. J.; YEW, A. L. S.; NG, S. B.; HUANG, Y.; BUTLER, M. S. Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. **Journal of Natural Products**, v.64, n.1, p.125-126, 2001.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.139–146, 2007.

DECKERT, R. J.; MEVILLE, L.H.; PETERSON, R. L. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle in the foliage of *Pinus strobus*. **Mycological Research**, v.105, p.991-997, 2001.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular biotechnology**, v.38, n.1, p.41–55, 2008.

DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.

DENIS, S.; CARLA, M.; KHATIMA, A. O. Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during *Leishmania* life cycle. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.2, p.200–203, 2012.

DJOUKENG, J. D.; POLLI, S.; LARIGNON, P.; ABOU-MANSOUR, E. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, p.303–308, 2009.

DUJARDIN, J. C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.; MAZERIS, A; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious diseases**, v.14, p.1013-1016, 2008.

DUPONT, S.; LEMETAIS, G.; FERREIRA, T.; CAYOT, P.; GERVAIS, P.; BENEY, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?. **Evolution**, v.66, n.9, p.2961–2968, 2012.

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

EATON, C. J.; COX, M. P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism?. **Plant science**, v.180, n.2, p.190–195, 2011.

EFDI, M.; ITOH, T.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; KOKETSU, M.; ISHIHARA, H. The isolation of secondary metabolites and in vitro potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.3667–3671, 2007.

EVIDENTE, A.; MASI, M.; LINALDEDDU, B. T.; FRANCESCHINI, A.; SCANU, B.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; MOTTA, A.; MADDAU, L. Afritoxinones A and B , dihydrofurofuran-2-ones produced by *Diplodia africana* the causal agent of branch dieback on *Juniperus phoenicea*. **Phytochemistry**, v.77, p.245–250, 2012.

EVIDENTE, A.; PUNZO, B. V.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; MELCK, D.; LUQUE, J. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. **Phytopathologia Mediterranea**, v.49, p.74–79, 2010.

FAGHIRI, Z.; CAMARGO, S. M.; HUGGEL, K.; FORSTER, I. C.; NDEGWA, D.; VERREY, F.; SKELLY, P. J. The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. **PLOS One**, v.5, n.5, p.e10451, 2010.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Visceral leishmaniasis: an update. **La Revue de Médecine Interne**, v.32, n.9, p.544–51, 2011.

FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGGIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses and Public Health**, v.55, n.3, p.145–148, 2008.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia, Bratislava**, v.62, p.251–257, 2007.

FRANQUET-GRIELL, H.; CHECA, A.; NÚÑEZ, O. SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; PUIGNOU, L. Determination of Polyphenols in Spanish Wines by Capillary Zone Electrophoresis. Application to Wine Characterization by Using Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.8340–8349, 2012.

GAO, X. X.; ZHOU, H.; XU D. Y.; YU, C. H.; CHEN, Y. Q.; QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth

revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.255-266, 2005.

GNANASEKAR, M.; SALUNKHE, A. M.; MALLIA, A. K.; HE, Y. X.; KALYANASUNDARAM, R. Praziquantel affects the regulatory myosin light chain of *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.53, n.3, p.1054-1060, 2009.

GOULART, M. O.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v.16, p.95-100, 1993.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.31010-31017, 2004.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.6, p.966–71, 2012.

GUNATILAKA L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v.69, p.509-526, 2006.

GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TRIGOS, Á.; FERNÁNDEZ, F. J.; YAÑEZ-MORALES, M. J.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.1473–1477, 2007.

HADIGHI, R.; MOHEBALI, M.; BOUCHER, P.; HAJJARAN, H.; KHAMESIPOUR, A.; OUELLETTE, M. Unresponsiveness to glucantime treatment in iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PloS Medicine**, v.3, p.e162, 2006.

HANAFI, H. A.; EL-DIN, EL-S. M. N.; EL-HOSSARY, S. S. I.; KALDAS, R. M.; VILLINSKI, J. T.; FURMAN, B. D.; FRYAUFF, D. J. Experimental acquisition, development, and transmission of *Leishmania tropica* by *Phlebotomus duboscqi*. **Acta tropica**, v.125, n.1, p. 37–42, 2013.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403–9, 2011.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids**, v.33, p.359-366, 2007.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three New Metabolites from Marine-Derived Fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.1, p.114–118, 1999.

HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. S. P.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M. T.; BONAMIGO, R. A.; TASSO, N.; OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.87, n.3, p.470–472, 2012.

HUTCHISON, L. J. Wood-inhabiting microfungi isolated from *Populus tremuloide* from Alberta and northeastern British Columbia. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.898-905, 1999.

ISLAM, S. M.; ISHIGAMI, K.; WATANABE, H. Synthesis of (-)-mellein, (+)-ramulosin, and related natural products. **Tetrahedron**, v.63, p.1074–1079, 2007.

JACKSON, M.; KARWOWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW, G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v.46, p.34-38, 1993.

JENNINGS, D. B.; EHRENSHAFT, M.; PHARR, D. M.; WILLIAMSON, J. D. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.15129–1533, 1998.

JERONIMO, S. M. B.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F. S.; CHENG, C.; MONTEIRO, G. R. G.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R. A.; KARPLUS, T. M.; XIMENES, M. F. F. M.; OLIVEIRA, C. C. G.; PINHEIRO, V. G.; PEREIRA, W.; PERALTA, J. M.; SOUSA, J. M. A.; MEDEIROS, I. M.; PEARSON, R. D.; BURNS, T. L.; PUGH, E. W.; WILSON, M. E. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.36, p.443-449, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. **Parasitology International**, v.54, n.3, p.177-183, 2005.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323–329, 2006.

JU, H. Y.; CHEN, S. C.; WU, K. J.; KUO, H. C.; HSEU, Y. C.; CHING, H., WU, C. R. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri* Lucidi with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.492–502, 2012.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, n.19, p.5678–5698, 2012.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. **Parasitology**, v.133, p.S87-S112, 2006.

KERN, F.; KLEIN, R. W.; JANSSEN, E.; BESTMANN, H. J.; ATTYGALLE, A. B.; SCHÄFER, D.; MASCHWITZ, U. Mellein, a trail pheromone component of the ant *Lasius fuliginosus*. **Journal of Chemical Ecology**, v.23,n.3, p.779-792,1997.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. New Secondary Metabolites from the Marine Endophytic Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1058-1063, 2004.

KOHNO, J.; KOGUCHI, Y.; NISHIO, M.; NAKAO, K.; KURODA, M. SHIMIZU, R.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S. Structures of TMC-95A-D: Novel Proteasome Inhibitors from *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. **Journal of Organic Chemistry**, v.65, p.990-995, 2000.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v.19, n.7, p.792–8, 2012.

LANG, T.; GOYARD, S.; LEBASTARD, M.; MILON, G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboured macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cellular Microbiology**, v.7, p.383-392, 2005.

LEE, J. S.; MA, C. M.; PARK, D. K.; YOSHIMI, Y.; HATANAKA, M.; HATTORI, M. Transformation of ergosterol peroxide to cytotoxic substances by rat intestinal bacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.5, p.949-954, 2008.

LI, G. H.; YU, Z. F.; LI, X.; WANG, X. B.; ZHENG, L. J.; ZHANG, K. Q. Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichum* sp. AL4. **Chemistry and Biodiversity**, v.4, p.1520-1524, 2007.

LIMA, I. D.; QUEIROZ, J. W.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, P. V. S.; PONTES, N. N.; BARBOSA, J. D. A.; MARTINS, D. R.; WEIRATHER, J. L.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B. Leishmania infantum chagasi in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.1, p.99–107, 2012.

LUZ, P. P.; MAGALHÃES, LIZANDRA G; PEREIRA, A. C.; Cunha, W. R.; Rodrigues, V.; Andrade-Silva, M. L. Curcumin-loaded into PLGA nanoparticles: preparation and in vitro schistosomicidal activity. **Parasitology research**, v.110, n.2, p.593–598, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in parasitology**, v.27, n.8, p.341–344, 2011.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 119, 2011.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.280-283, 2005.

MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. **Science**, v.315, p.513–515, 2007.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; DELLA-TOGNA, G.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; GERWICK, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Antileishmanial constituents of the panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, v.71, p.2011-2014, 2008.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; CHERIGO, L.; HIGGINBOTHAM, S.; ARNOLD, E.; SPADAFORA, C.; IBÁÑEZ, A.; GERWICK, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **International Microbiology**, v.14, p.95–102, 2011.

MARTÍNEZ-LUIS, S., CHERIGO, L., SPADAFORA, C., GERWICK, W. H., CUBILLA-RIOS, L. Additional Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. **Revista Latinoamericana de Química**, v.37, p.104-114, 2009.

McCONVILLE, M. J.; SOUZA, D.; SAUNDERS, E.; LIKIC, V. A.; NADERER, T. Living in a phagolysosome: metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in biotechnology**, v.23, n.8, p.368–375, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2nd ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites & vectors**, v.4, n.1, p.52, 2011.

MONTE-ALEGRE, A.; OUAISSI, A.; SERENO, D. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.5 p.6-16, 2006.

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

MULVENNA, J.; MOERTEL, L.; JONES, M. K.; NAWARATNA, S.; LOVAS, E. M.; GOBERT, G. N.; COLGRAVE, M.; JONES, A.; LOUKAS, A.; MCMANUS, D. P. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. **International journal for parasitology**, 40, n.5, p.543-554, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311–335, 2012.

NISHIDA, R.; BAKER, T. C.; ROELOFS, W. L. Hair pencil pheromone components of male oriental fruit moths, *Grapholitha molesta*. **Journal of Chemical Ecology**, v.8, n.6, p.947–959, 1982.

OLIVEIRA, C. I.; NASCIMENTO, I. P.; BARRAL, A.; SOTO, M.; BARRAL-NETTO, M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. **Parasitology International**, v.58, p.319–324, 2009.

OLSRUD, M.; MICHELSEN, A.; WALLANDER, H. Ergosterol content in ericaceous hair roots correlates with dark septate endophytes but not with ericoid mycorrhizal colonization. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, n.5, p.1218–1221, 2007.

OSONO, T.; TAKEDA, H. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. **Mycologia**, v.94, p.421–427, 2002.

OWEN, R. W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. **Clinical Chemistry**, v.46, n.7, p.976–988, 2000.

PALATNIK-de-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.4, n.1, p.197, 2011.

PALATNIK-de-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v.26, p.1709–1724, 2008.

PALMIERI, D.; ALIAKBARIAN, B.; CASAZZA, A. A.; FERRARI, N.; SPINELLA, G.; PANE, B.; CAFUERI, G.; PEREGO, P.; PALOMBO, D. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. **Microvascular Research**, v.83, n.3, p.281–289, 2012.

PARISI, A.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C.; MAGNANO, G.; SAN-LIO, G. M. Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. **Phytochemistry**, v.32, n.4, p.865–867, 1993.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A. JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R. O.; BARREL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v.39, 839–847, 2007.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. A New Dihydrobenzofuran Derivative from the Endophytic Fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.55, p.1404–1405, 2007.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v.57, n.6, p.515–518, 1991.

PONTE-SUCRE, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid Biology and disease**, v.2, p.1-10, 2003.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, v.49, p.291–315, 2011.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; SILVA, S. R.; MOURA-JÚNIOR, A. J.; NETO, R. G. T.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. N.; GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, n.10, p.579–85, 2011.

RAMOS, H. P. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas**. 2008. 60 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.629-632, 2010.

RAMOS, H. P.; SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.2, p.443-449, 2011.

RAMOS-LIGONIO, A.; LÓPEZ-MONTEON, A.; TRIGOS, A. Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. **Phytotherapy Research**, v.26, n.6, p.938–943, 2012.

RAYANIL, K. O.; BUNCHORNMASPAN, P.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P. A new phenolic compound with anticancer activity from the wood of *Millettia leucantha*. **Archives of Pharmacal Research**, v.34, n.6, p.881–886, 2011.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v.298, p.1581, 2002.

REIGOSA, M. J.; MALVIDO-PAZOS, E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 7, p. 1456–66, 2007.

RICHARDSON, M. D.; LOGENDRA, S. Ergosterol as an Indicator of Endophyte Biomass in Grass Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3903–3907, 1997.

ROMERO, C.; BRENES, M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.36, p.9017–9022, 2012.

ROY, K. W.; BAIRD, R. E.; ABNEY, T. S. A Review of Soybean (*Glycine max*) Seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. **Mycophatologia**, v.150, p.15-27, 2000.

RUDGERS, J. A.; KOSLOW, J. M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v.7, p.42-51, 2004.

RUKACHAISIRIKUL, V.; ARUNPANICHLERT, J.; SUKPONDMA, Y. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, v.65, n.51, p.10590–10595, 2009.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p.315–317, 1998.

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

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.7, n.9, p.1753–1760, 2009.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.27–32, 2005.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; GRAMICCIA, M.; CAÑAVATE, C.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.24, p.135-142, 2008.

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

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DÖRING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v.99, n.8, p.1007–1015, 1995.

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.389-395, 2008.

SEIDEL, J. L.; W, E. W.; DAVIDSON, D W. Neotropical ant gardens I. Chemical Constituents. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, n.6, p.1791–1816, 1990.

SEN, R.; BANDYOPADHYAY, S.; DUTTA, A.; MANDAL, G.; GANGULY, S.; SAHA, P.; CHATTERJEE, M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1213-1218, 2007.

SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v.56, p.3-7, 2007.

SHAW, J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.541-547, 2007

SHARLOW, E. R.; CLOSE, D.; SHUN, T.; LEIMGRUBER, S.; REED, R.; MUSTATA, G.; WIPF, P.; JOHNSON, J.; O' NEIL, M.; GRÖGL, M.; MAGILL, A. J.; LAZO, J. S. Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p.e540, 2009.

SHEU, Y. W.; CHIANG, L. C.; CHEN, I. S.; CHEN, Y. C.; TSAI, I. L. Cytotoxic flavonoids and new chromenes from *Ficus formosana* f. *formosana*. **Planta Medica**, v.71, n.12, p.1165–1167, 2005.

SHIBAZAKI, M.; TANIGUCHI, M.; YOKOI, T.; NAGAI, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO, T. YM-215343, a novel antifungal compound from *Phoma* sp. QN04621. **Journal of Antibiotics**, v.57, p.379-382, 2004.

SHIRANE, N.; TAKENAKA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, K.; ISHII, H. Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. **Phytochemistry**, v.41, p.1301-1308, 1996.

SIMON, A.; TÓTH, G.; LIKTOR-BUSA, E.; KELE, Z., TAKÁCS, M.; GERGELY, A.; BÁTHORI, M. Three new steroids from the roots of *Serratula wolffii*. **Steroids**, v.72, n.11, p.751-755, 2007.

SLININGER, P. J.; BURKHEAD, K. D.; SCHISLER, D. A. Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.31, n.11, p.517–524, 2004.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. Hydronaphthalenones and a dihydroramulosin from the endophytic fungus PSU-N24. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.56, n.12, p.1687–1690, 2008.

SRINIVAS, N.; PALNE, S.; NISHI, S.; GUPTA, S.; BHANDARI, K. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v.19, p.324-327, 2009.

SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. **Journal of Natural Products**, v.71, n.8, p.1393–1398, 2008.

SUN, L.; ISAAK, C. K.; ZHOU, Y.; PETKAU, J. C.; O, K.; LIU, Y.; SLOW, Y. L. Salidroside and tyrosol from *Rhodiola* protect H9c2 cells from ischemia/reperfusion-induced apoptosis. **Life Sciences**, v.91, p.151–158, 2012.

TANSUWAN, S.; PORNPAAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; MUANGSIN, N.; SIHANONTA, P.; CHAICHIT, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v.70, p.1620-1623, 2007.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, p.448-459, 2001.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **Journal of Nutrition**, v.131, n.5, p.1409–1413, 2001.

TEMPONE, A. G.; TANIWAKI, N. N.; REIMÃO, J. Q. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. **Parasitology Research**, v.105, p499-505, 2009.

TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S. Endophytes-Mines of Pharmacological therapeutics. **World Journal of Science and Technology**, v.1, n.5, p.127–149, 2011.

THORMANN, M. N.; CURRAH, R. S.; BAYLEY, S. E. Patterns of distribution of microfungi in decomposing bog and fen plants. **Canadian journal of botany**, v.82, n.5, p.710-720, 2004.

TOLEDO, J. S.; VASCONCELOS, E. J. R.; FERREIRA, T. R.; CRUZ, A. K. Using Genomic Information to Understand *Leishmania* Biology. **Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 156–166, 2010.

TORRES, J. A.; SNELLING, R. R.; BLUM, M. S.; Flournoy, R. C.; Jones, T. H.; Duffield, R. M. Mandibular gland chemistry of four Caribbean species of *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.7, p.673–680, 2001.

TORRES-SANTOS, E. C.; SAMPAIO-SANTOS, M. I.; BUCKNER, F. S.; YOKOYAMA, K.; GELB, M.; URBINA, J. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.469-472, 2009.

TRIGOS, A.; ORTEGA-REGULES, A. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. **Mycologia**, v.94, n.4, p.563–568, 2002.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.311–318, 2009.

VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.501, n.1, p.106–111, 2010.

VIDES, J. P.; SCHWARDT, T. F.; SOBRINHO, L. S. V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 178, p. 22–28, 2011.

VIVANCOS, M.; MORENO, J. J. Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. **The British Journal of Nutrition**, v.99, n.6, p.1199–1207, 2008.

VOEGTLE, H. L.; JONES, TAPPEY H; DAVIDSON, DIANE W; SNELLING, ROY R. E-2-ethylhexenal, E-2-ethyl-2-hexenol, mellein, and 4-hydroxymellein in *Camponotus* species from Brunei. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, n.2, p.215–9, 2008.

WANG, F.; FANG, Y.; ZHANG, M.; LIN, A.; ZHU, T.; GU, Q.; ZHU, W. Six new ergosterols from the marine-derived fungus *Rhizopus* sp. **Steroids**, v.73, n.1, p.19–26, 2008.

WENG, Y.; XIANG, L.; MATSUURA, A.; ZHANG, Y.; HUANG, Q.; QI, J. Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via *UTH1* gene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.3, p.999–1002, 2010.

WERNECK, G. L.; RODRIGUES Jr, L.; SANTOS, M. V.; ARAÚJO, I. B.; MOURA, L. S.; LIMA, S. S.; GOMES, R. B. B.; MAGUIRE, J. H.; COSTA, C. H. N. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v.83 p.13–18, 2002.

WHITE, J. F.; TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. **Physiologia Plantarum**, v.138, n.4, p.440–446, 2010.

WILLIAMS, D. R.; KAMMLER, D. C.; DONNELL, A. F.; GOUNDRY, W. R. F. Total synthesis of (+)-Apiosporamide: assignment of relative and absolute configuration. **Angewandte Chemie**, v.117, p.6873-6876, 2005.

WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; MATHIS, A.; TEVIS, D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**, v.90, p.999-1014, 2008.

WIRTH, D. A harvest not yet reaped: Genomics to new drugs in Leishmania and trypanosomes. **Médecins Sans Frontière/Drugs for Neglected Diseases Working Group**, p.33-39, 2001.

WOHLFARTH, C.; EFFERTH, T. Natural products as promising drug candidates for the treatment of hepatitis B and C. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.30, n.1, p.25–30, 2009.

YANG, L. M.; HU, R.; QI, W.; PENG, X.; FU, H. Z. Chemical constituents of *Rhodiola kirilowii* Maxim. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.2, p.154–158, 2011.

ZENG, Z. X.; MA, W. H.; LI, Y. L.; HAN, T.; ZHENG, C. J.; QIN, L. P. Two New Diterpenes from *Solidago canadensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v.95, p.1121–1125, 2012.

ZHANG, Y.; MILLS, G. L.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.26, p.7581–7585, 2002.

ZHANG, Y.; RAO, R. Beyond ergosterol: Linking pH to antifungal mechanisms. **Virulence**, v.1, n.6, p.551–554, 2010.

ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.28, n.5, p.2107–2112, 2012.

ZHAO, X. R.; LIN, Q.; BROOKES, P. C. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 311–317, 2005.