

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrimum* 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: \_\_\_\_\_

## 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  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT e 2D: COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . 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  $\text{Cl}_{50}$  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  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  and DEPT and 2D: COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . 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  $\text{IC}_{50}$  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.

## 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 conseqüentemente as humanas (MAIA; CAMPINO, 2011).

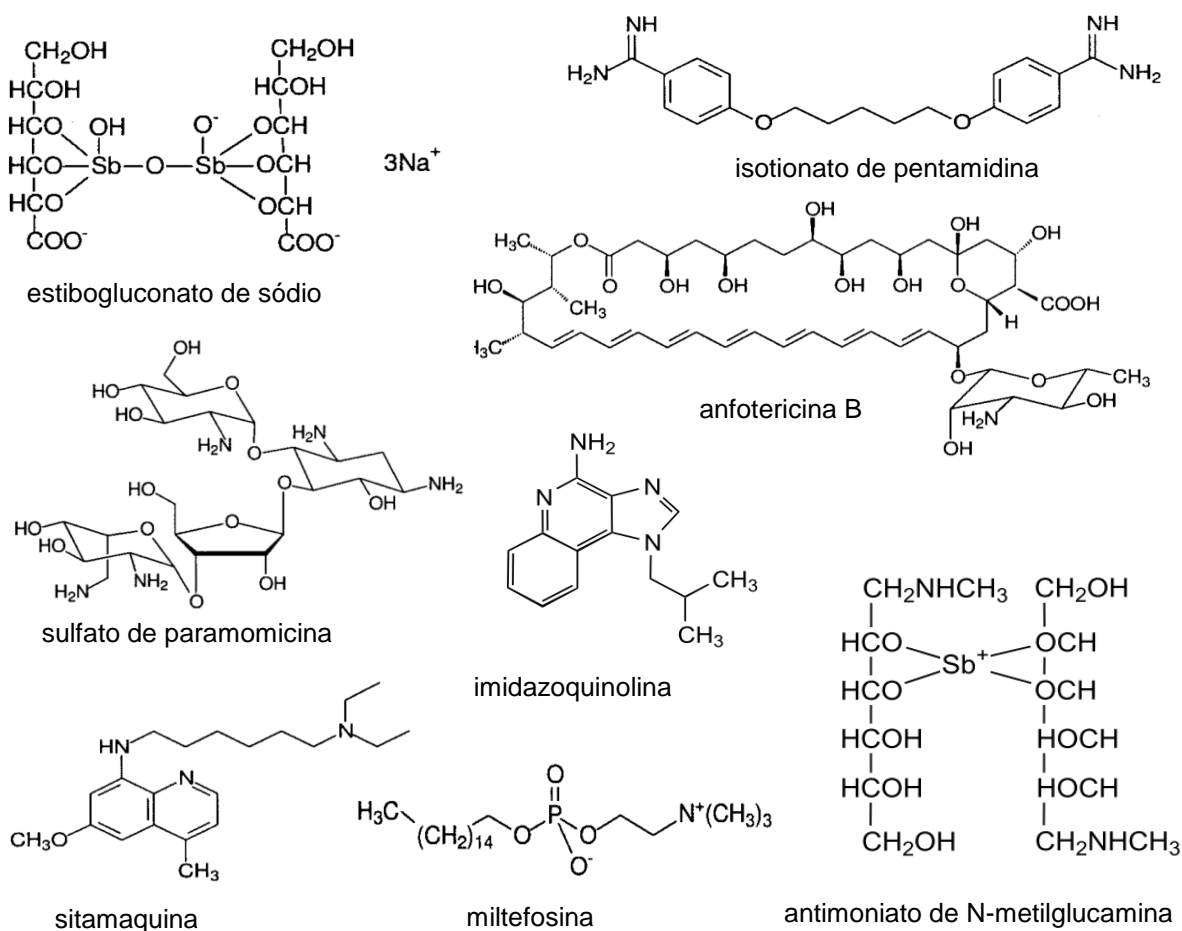
No Brasil, as medidas efetivas preconizadas pelo Ministério da Saúde, para o controle de leishmaniose humana, são o rápido diagnóstico e tratamento, controle dos vetores pelo uso de inseticidas, melhoria das condições sanitárias nas áreas em que ocorre o surgimento de focos da doença e em áreas onde 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 flebotomínicos, 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 conseqüentemente, 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 antimonial 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 antimonial 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- $\gamma$ . 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<sup>®</sup> 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).

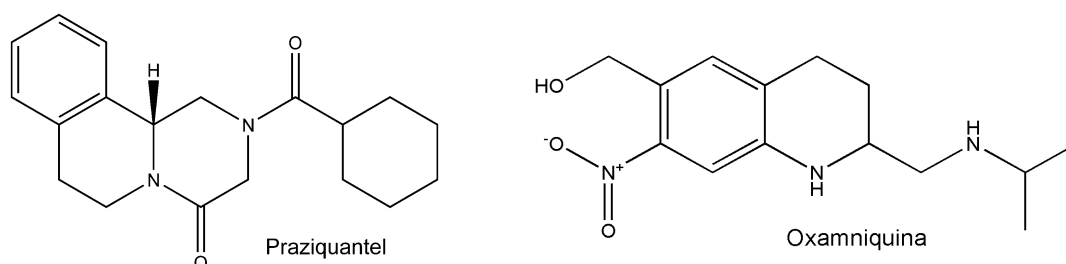
O conhecimento genômico e análises comparativas por biologia molecular, de várias espécies de *Leishmania* tem possibilitado uma melhor compreensão sobre a biologia do parasita, sua patogenicidade e virulência, possibilitando a identificação de novos alvos terapêuticos (TOLEDO et al., 2010).

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, imunossuppressores e redutores de níveis de colesterol (DEMAIN; ADRIO, 2008). Produtos microbiológicos são também amplamente

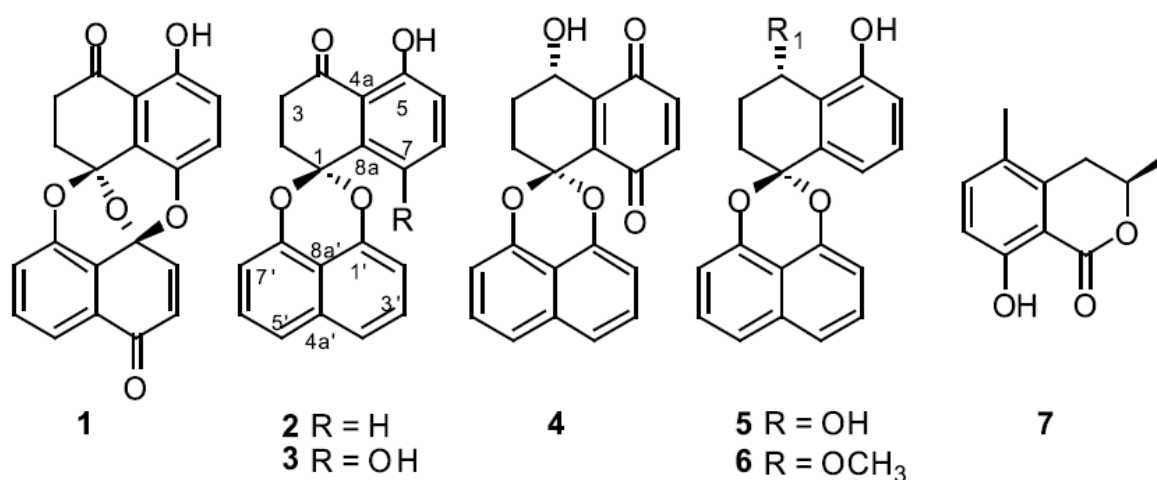
comercializados como produtos para agricultura e saúde animal, como biopesticidas incluindo agentes antifúngicos, bioinseticidas, bioherbicidas e agentes antiparasitários, principalmente anti-helmínticos (DEMAIN, 2007).

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).

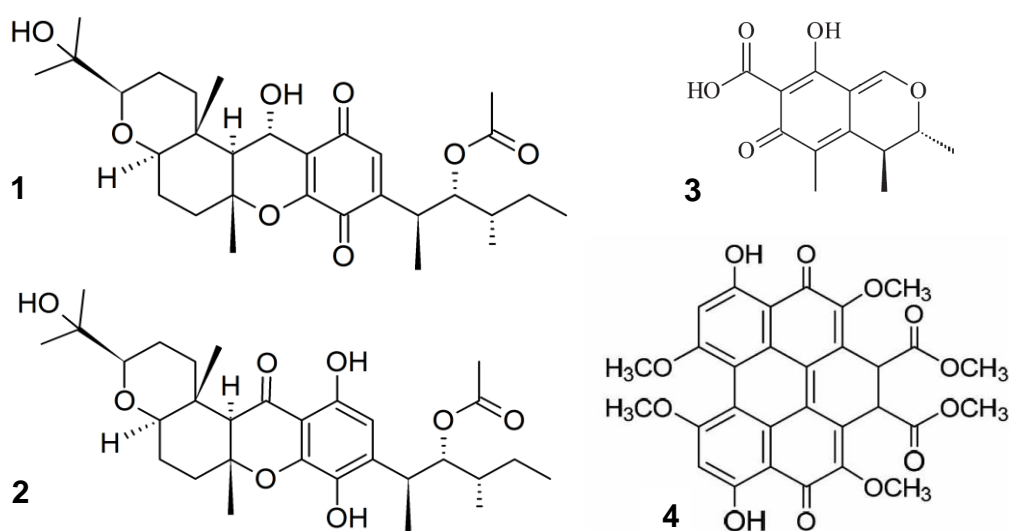
Em todas as interações endofíticas, o caráter assintomático de colonização dá-se através de um equilíbrio de antagonismos, entre a virulência do fungo e a defesa da planta, na qual há produção de metabólitos de interesses opostos por parte de ambos. Fungos secretam enzimas e outros metabólitos, necessários 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 EG<sub>1</sub>, 2 - palmarumicina CP<sub>2</sub>, 3 - palmarumicina CP<sub>17</sub>, 4 - palmarumicina CP<sub>18</sub>, 5 - CJ-12,371 6 - palmarumicina CP<sub>19</sub> e 7 - 5-metilocracina

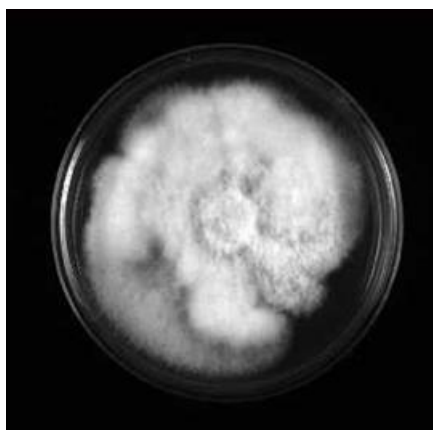


**Figura 4.** Metabólitos secundários com atividade antileishmania provenientes dos fungos endofíticos *Cochliobolus* sp. (1 - cochlioquinona A e 2 - isocochlioquinona A), *Penicillium janthinellum* (3 - citrinina) e *Mycosphaerella* sp. (4 - cercosporina)



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

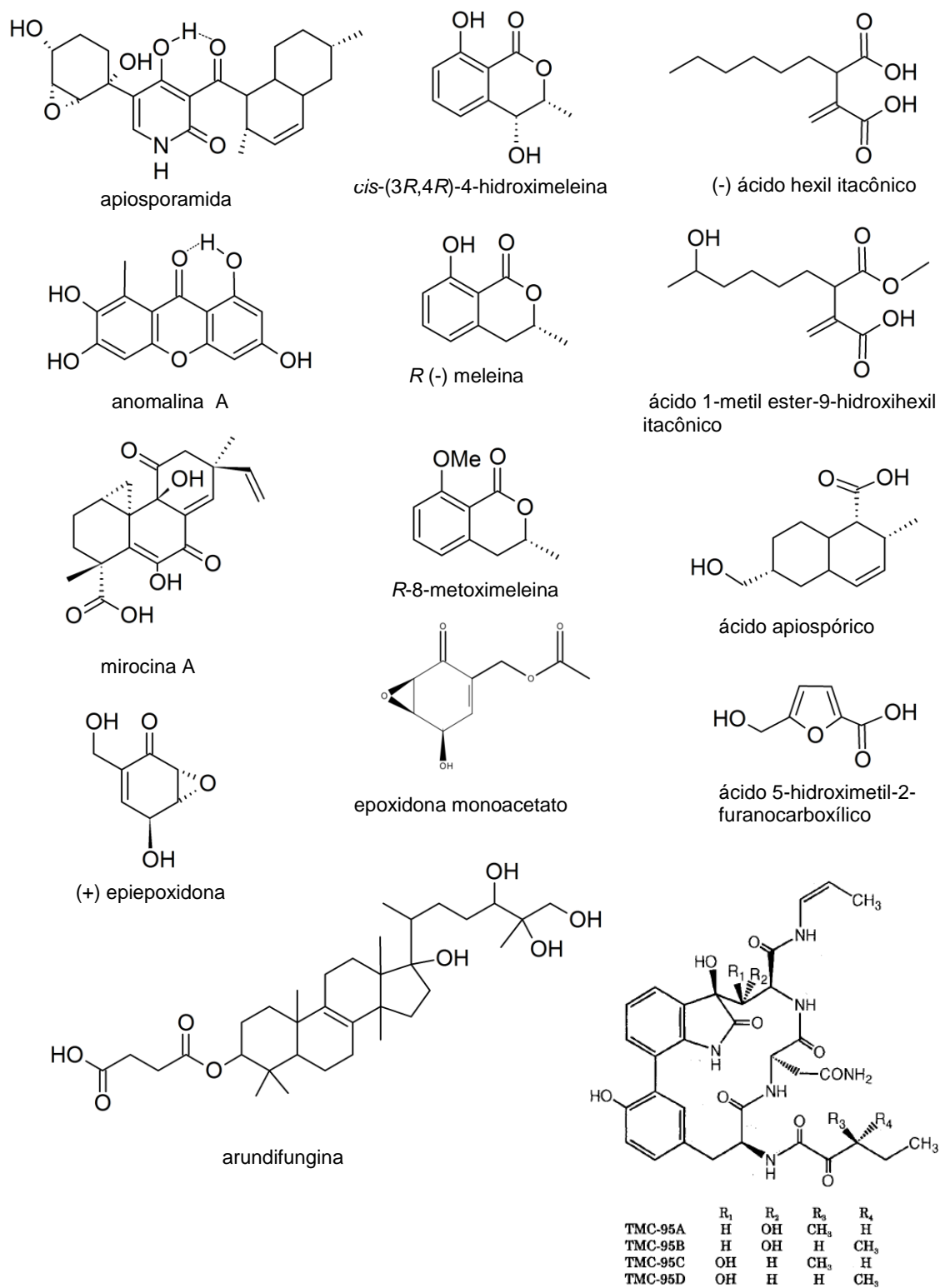
O fungo, *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. (= *Arthrinium arundinis*), quando cultivado em meio BDA a 30 °C por um período de 96 horas, apresenta micélio vegetativo esbranquiçado, de aspecto aveludado com marcações de crescimento radiais e hifas vegetativas pouco ramificadas, hialinas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



**Figura 5.** Fungo *Arthrinium* 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- $\kappa$ 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 (CI<sub>50</sub>) 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*.

## 2. OBJETIVOS

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

### 2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos podem ser assim enumerados:

1. Cultivar o fungo endofítico *Arthrinium* 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.

## 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.