

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**RÊGILA MELLO DO NASCIMENTO**

**Avaliação da atividade leishmanicida do filtrado do fungo *Aspergillus fumigatus* contra *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*.**

**Manaus – AM**

**2018**

**RÉGILA MELLO DO NASCIMENTO**

**Avaliação da atividade leishmanicida do filtrado do fungo *Aspergillus fumigatus* em *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*.**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas - UEA como requisito para conclusão do curso de Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Liliane Coelho da Rocha**

**Manaus – AM**

**2018**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

527a Nascimento, Rêgila Mello do  
Avaliação da atividade leishmanicida do filtrado  
o fungo *Aspergillus fumigatus* contra *Leishmania* (V.) *g*  
*yanensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. / Rêgila  
Mello do Nascimento. Manaus : [s.n], 2018.  
36 f.: color.; 3 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas -  
Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas,  
Manaus, 2018.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Rocha, Liliane Coelho da

1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). 2.  
Biotecnologia . 3. Fungos do Solo. I. Rocha, Liliane  
Coelho da (Orient.). II. Universidade do Estado do A  
zonas. III. Avaliação da atividade leishmanicida  
o filtrado do fungo *Aspergillus fumigatus* contra  
*Leishmania* (V.) *guyanensis* e *Leishmania* (L.) *ama*  
*onensis*.



GOVERNO DO ESTADO DO  
**AMAZONAS**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: <i>Régila Mello do Nascimento</i>
TÍTULO DO TCC: <i>Avaliação da atividade leishmanicida do extrato do fungo <u>Aspergillus fumigatus</u> sobre formas promastigotas e amastigotas de <u>Leishmania guyanensis</u> e <u>Leishmania amazonensis</u>.</i>


### AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: <i>(Coordenador)</i>	<i>8,5</i>
b) 1º avaliador(a):	<i>8,6</i>
c) 2º avaliador(a):	<i>8,3</i>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<i>8,4</i>

MÉDIA DA NOTA: *8,4*

Manaus, *20* de *novembro* de 2018

### ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

  
\_\_\_\_\_  
Orientador(a) (COORDENADORA)

  
\_\_\_\_\_  
1º Avaliador(a)

  
\_\_\_\_\_  
2º Avaliador(a)

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e bênçãos recebidas ao longo de toda essa caminhada.

À minha família, meus irmãos Geiza, Deice, Ricardo, pela confiança, e em especial aos meus pais José Ricardo e Maria das Graças, pelo amor incondicional, suportando a saudade na certeza de sempre me proporcionar o melhor.

À minha orientadora, Dra. Liliane Coelho, que desde o início, mesmo sem me conhecer aceitou me orientar e foi paciente em me ensinar todas as técnicas necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos Klaiane, Ítalo e Xaiane, por sempre estarem presentes ao longo dessa jornada. A Tarcila Alves por sempre ser atenciosa e gentil em me ensinar o necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Raquel, Adriely e Julie, pela amizade que construímos praticamente no fim da graduação, mas que se tornaram pessoas maravilhosas e importantes, tornando esses meses únicos com suas brincadeiras.

A Coleção de Microrganismo de Interesse Médico em colaboração em Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e ao Laboratório da Cultura de Célula da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas (UFAM) pelo suporte físico concedido para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À todos os professores da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pelo ensinamento transmitido ao longo dessa caminhada.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical, endêmica, considerada negligenciada, causada por espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Atualmente o Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) é considerado pelo Ministério da Saúde como medicamento de primeira escolha para o tratamento desta doença. O uso da biotecnologia na busca por novos compostos com atividade leishmanicida é importante para produção de novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos adversos aos pacientes com LTA. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida de substâncias produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* isolado do solo da região Amazônica contra *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*. O filtrado fúngico foi diluído em meio RPMI e distribuído em diferentes concentrações (750 µg/mL à 125 µg/mL) em tubos contendo  $1,5 \times 10^6$  células/mL. Como controle negativo foi utilizado o RPMI e como controle positivo o Glucantime® (30 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicatas e incubados em estufa a 25°C por 72 horas. A cada 24 horas, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra que foi diluída (1:1000) e quantificada em câmara de Neubauer. A análise estatística mostrou que a concentração 750 µg/mL à 72 horas apresentou atividade leishmanicida contra *L. guyanensis*, pois houve redução no número de indivíduos vivos comparado ao controle negativo ( $p=0,019$ , ANOVA). O valor de  $CI_{50}$  para *L. guyanensis* foi de  $65,46 \times 10^{-1}$  µg/mL. Contudo, para *L. amazonensis* não foi verificada atividade leishmanicida, sugerindo que o extrato de *A. fumigatus* apresenta atividade leishmanicida distinta de acordo com a espécie de *Leishmania*. A avaliação de inibição do óxido nítrico mostrou que o extrato não possui atividade anti-inflamatória, não sendo necessário o teste de citotoxicidade em macrófagos.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Biotecnologia, Fungos do Solo.

## Lista de Figuras

Figura 1. A- Forma amastigota de <i>Leishmania</i> sp. em macrófagos B- Forma promastigota de <i>Leishmania</i> sp.....	13
Figura 2. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.....	14
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. ....	15
Figura 4. Micronídeos (A) e colônia (B) de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	17
Figura 5. Curva de Crescimento de <i>L. guyanensis</i> (A) e <i>L. amazonensis</i> (B). ....	25
Figura 6. Avaliação do extrato de <i>A. fumigatus</i> testado contra <i>L. guyanensis</i> no período de 24, 48 e 72 horas. ....	27
Figura 7. Avaliação do extrato de <i>A. fumigatus</i> testado contra <i>L. amazonensis</i> no período de 24, 48 e 72 horas. ....	28
Figura 8. Ensaio de inibição do óxido nítrico com <i>A. fumigatus</i> em macrófagos Raw 264.7. ....	30

## SUMÁRIO

RESUMO.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1 Leishmaniose .....	12
2.2 Agente Etiológico .....	13
2.3 Vetor .....	14
2.4 Ciclo de vida.....	15
2.5 Tratamentos para Leishmaniose.....	16
2.6 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral .....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Obtenção do filtrado fúngico .....	20
3.2 Manutenção dos Parasitos.....	21
3.3 Curva de crescimento .....	21
3.4 Determinação da atividade leishmanicida e da concentração efetiva 50% (CI <sub>50</sub> ) em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	21
3.5 ESTUDO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS .....	22
3.5.1 Células Raw 264.7.....	22
3.5.2 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico (NO) .....	23
3.5.3 Quantificação de nitrito (NO <sub>2</sub> ) .....	23
3.6 Análise Estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1 Curva de crescimento .....	25



4.2 Avaliação da atividade Leishmanicida do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> em formas promastigotas de <i>L. guyanensis</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	26
4.3 Efeito do extrato de <i>A. fumigatus</i> sobre inibição de óxido nítrico (NO°).....	29
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária crônica, considerada negligenciada, causada por cerca de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae. Com ciclo de vida heteroxênico, o protozoário alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, chegando a afetar mundialmente mais de 15 milhões de pessoas com alta morbidade e mortalidade em populações da América, Ásia, África, Europa e Oceania (JENSEN et al., 2017; SORIANO, 2017).

A transmissão da doença nas Américas ocorre por insetos dípteros do gênero *Lutzomyia*. O gênero *Leishmania* na LTA pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie envolvida e da relação parasito-hospedeiro, podendo ser classificadas em Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucosa (LM). As principais espécies de LC no Brasil são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (LIMA, 2017).

O Brasil é um país da América com elevado número de casos de leishmaniose. Em 2016, foram registrados 12.690 casos, com destaque para região Norte com 5.075, seguida da região Nordeste com 3.166 e da região Centro-Oeste com 1.974 dos casos (SINAN/SVS/MS, 2017).

No estado do Amazonas, os municípios de Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, junto à Manaus, foram responsáveis por 468 casos de 922, registrados no Estado, ocupando o segundo lugar entre as infecções por protozoários que acometem humanos, perdendo apenas para Malária (AMAZONAS, 2017).

Apesar do elevado número de casos registrados no Brasil, poucos são os fármacos utilizados para tratamento da leishmaniose. O antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) é considerado pelo Ministério da Saúde o medicamento de primeira escolha e como segunda escolha a anfotericina B e pentamidina (BRASIL, 2017).

Existem vários problemas relacionados a esse arsenal terapêutico, como efeitos colaterais, toxicidade e administração parenteral, o que leva, muitas das

vezes, ao abandono do tratamento, e aumento de linhagens resistentes ao antibiótico, dificultando o controle da doença (WYREPKOWSHI, 2015; ABDOSSAMADI; SEYED; RAFATI, 2016).

Por ser considerada uma doença negligenciada, poucos são os investimentos de indústrias farmacêuticas frente às pesquisas de novos protótipos com atividades leishmanicida. Apesar da escassez de investimento, uma das fontes biológicas mais estudadas em busca de formas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose são as plantas e os fungos por produzirem metabólitos secundários de interesse biotecnológico e farmacêutico, como demonstrado nos estudos de Costa, Pinheiro e Silva (2009), Monzote et al. (2010) e Campos et al. (2015).

Na perspectiva de se obterem novas formas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida de substâncias produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* isolado de amostra do solo da região Amazônica contra *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças que pode se apresentar de diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro, podendo ser divididas em Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar (cutânea e mucosa) (OZBILGIN et al., 2018; VASCONCELOS, 2017).

Pesquisas independentes realizadas durante o século XIX por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Whright, Linderberg e Vianna, foram importantes para identificar o parasito causador da Leishmaniose. No entanto, somente em 1903, Ronald Ross, um pesquisador militar inglês, deu o nome genérico *Leishmania*, (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana tem uma ampla distribuição mundial, presente em 88 países e pode se manifestar em três formas clínicas: leishmaniose cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Nas Américas ela está presente em 18 países, com maior prevalência no Brasil (CUNHA, 2017).

Em 2017, os delegados dos países endêmicos, aprovaram o Plano de Ação de Leishmanioses nas Américas 2017-2022, onde foram estabelecidas quatro metas a serem alcançadas até 2022 com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade dos casos de leishmaniose nas Américas. (OPAS/OMS, 2018):

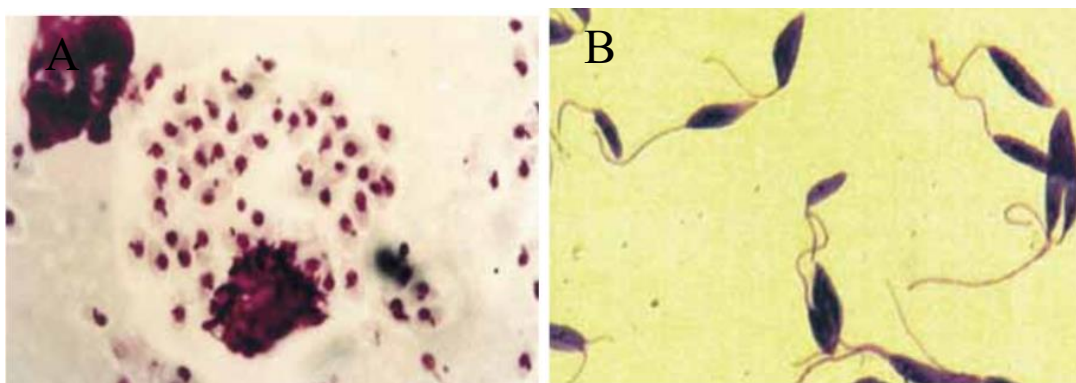
- 1) Reduzir a letalidade por Leishmaniose Visceral em 50%;
- 2) reduzir as mortes por Leishmaniose Cutânea/Mucosa em 90%;
- 3) reduzir a proporção de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos em 50% e;
- 4) reduzir a incidência de leishmaniose visceral, tendo em vista os diferentes cenários epidemiológicos dos países endêmicos.

## 2.2 Agente Etiológico

A leishmaniose é causada pelo parasito do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae que compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo e de uma organela rica em DNA, o cinetoplasto (BRASIL, 2017).

O protozoário pode apresentar-se sobre a forma amastigota (Figura 1-A) que tem forma arredondada e ausência de flagelo externo e que são encontradas em fagócitos mononucleados de mamíferos ou na forma promastigota (Figura 1-B) que são flageladas e encontram-se no intestino do vetor (BRASIL, 2017; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Figura 1. A- Forma amastigota de *Leishmania* sp. em macrófagos B- Forma promastigota de *Leishmania* sp.



Fonte: BRASIL, 2017

As formas promastigotas são consideradas fáceis de serem cultivadas por isso são as mais estudadas. No estado do Amazonas, foram descritas sete espécies de *Leishmania* como agente etiológico da LTA: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* e *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi*. Até o momento a Leishmaniose Visceral não ocorre no estado (GUERRA et al. 2015).

### 2.3 Vetor

Os vetores da LTA são flebotomíneos da ordem Díptera, família Psychodidae, que são distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). São conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Figura 2). A fêmea do flebotomíneo transmite a doença através do repasto sanguíneo (BRASIL, 2017).

Figura 2. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.



Fonte: BRASIL, 2017.

A primeira evidência experimental da transmissão de protozoários do gênero *Leishmania* pela picada de uma fêmea ocorreu em 1931 por Shortt, sendo os únicos insetos comprovadamente capazes de transmitir a doença. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são do gênero *Lutzomyia* (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

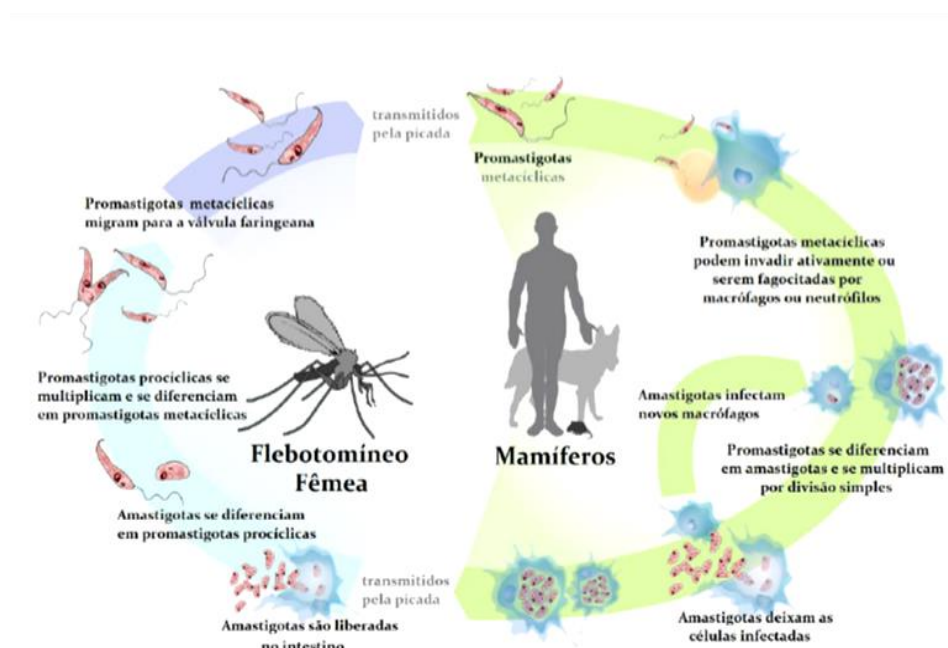
Para o estado do Amazonas, em particular na região de Manaus, as espécies envolvidas na transmissão do parasito são o *Lu. umbratilis* e *Lu. anduzei*, vetores da *L. guyanensis* ( GUERRA et al. 2015).

## 2.4 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Leishmania* sp. é digenético, ocorrendo em hospedeiro invertebrado e hospedeiro vertebrado (Figura. 3). O protozoário é infectante durante todo seu estágio de vida, porém o inseto flebotomíneo transmite a forma promastigota metacíclica, que é a forma mais infecciosa (KANSAL et al. 2012).

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o flebotomíneo ingere a forma amastigota. Ao chegarem no intestino médio, essas formas são envolvidas pela matriz peritrófica, e nas primeiras 48 horas se transformam em promastigotas procíclicas. Após 2 a 5 dias, ocorre o aparecimento da fase nectomonas, seguida da fase metacíclica (KAYE & SCOTT, 2011).

Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.



Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o inseto infectado inocula o parasito juntamente com a saliva que tem propriedades anticoagulante e vasodilatadora. Além disso, a saliva do flebotomíneo é quimiotática para monócitos e imunorreguladora, com capacidade de interagir com macrófagos, impedindo suas ações efectoras contra o parasito e aumentando a sua proliferação (KAYE & SCOTT, 2011).

A forma promastigota metacíclica é encontrada dentro do vacúolo parasitóforo e se transforma na forma amastigota. As amastigotas se multiplicam até o momento em que são liberadas da célula e passam a ser internalizadas por outros macrófagos (KAYE & SCOTT, 2011).

## 2.5 Tratamentos para Leishmaniose

A terapia convencional da Leishmaniose consiste basicamente em quatro fármacos: antimoniais pentavalentes, pentamidinas, anfotericina B desoxicolato e anfotericina B lipossomal (BRASIL, 2017).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose é antimoniato de N-metilglucamina (Glucatime®). Esse fármaco é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas de LTA, mas quando não há uma resposta satisfatória com os antimoniais os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B encontrada em formulações lipídicas e desoxicolato e as pentamidinas que são altamente eficaz nas infecções por *L. guyanensis* e *L. braziliensis* (BRASIL, 2017; GUERRA et al. 2015).

De modo geral, todas as terapias disponíveis apresentam alta toxicidade, baixa eficácia e altos custos, além disso, cepas de *Leishmania* sp. já apresentam resistência aos antimoniais e se tem observado elevadas taxas de recaídas. Assim, faz-se necessário a buscas de novas alternativas terapêuticas (BRASIL, 2017; GUERRA et al. 2015) .



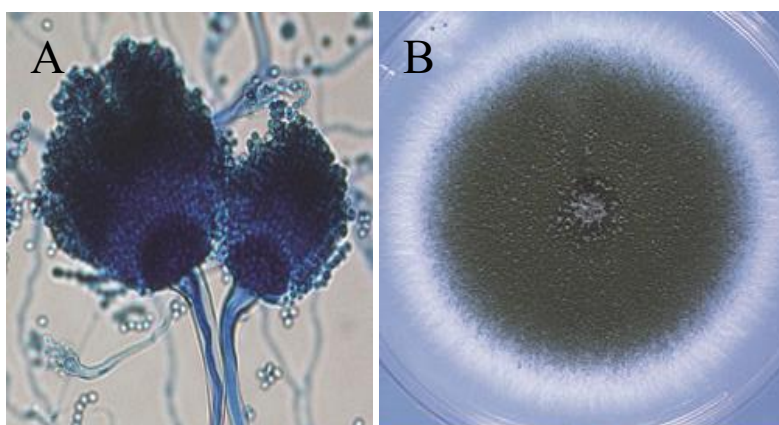
## 2.6 Gênero *Aspergillus*

Os fungos são microrganismos eucariontes de grande importância para o ecossistema, além de serem responsáveis por uma gama de metabólitos primários e secundários que são utilizados em diferentes áreas. Muitas espécies do gênero *Aspergillus* são utilizadas na biotecnologia para a produção de várias substâncias, como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos ou enzimas, ou como agentes em muitas fermentações alimentares (SAMSON et al. 2014).

A espécie *Aspergillus fumigatus* é um fungo saprófita (Figura 4 – A e B) pertencente à Família Trichocomaceae, filo Ascomycota que cresce bem no solo com material orgânico e possui um importante papel na reciclagem de carbono e nitrogênio (CHOWDHARY; MEIS, 2018).

O fungo pode crescer em diferentes de nichos ecológicos por possuir características distintas como a produção de conídios abundantes, muito pequenos e hidrofóbicos e tolerância térmica de até 50°C que podem explicar sua patogenicidade para humanos e animais (CHOWDHARY; MEIS, 2018).

Figura 4. Micronídeos (A) e colônia (B) de *Aspergillus fumigatus*



Fonte: <https://mycology.adelaide.edu>

Estudos voltados para compostos bioativos têm demonstrado que este fungo, quando isolado de plantas, possuem um potencial biológico antifúngico (LIU et al. 2004) e antibacteriano (CARVALHO, 2010; SILVA et al. 2018).

Quanto a atividade antiparasitária nenhum estudo até o momento foi realizado com esta espécie, no entanto, Elkhayat et al. (2015) e Silva et al. (2017) demonstraram, em seus estudos, que espécies do gênero *Aspergillus* possuem ação antileishmania, o que nos levou a investigar se a espécie *Aspergillus fumigatus* possui tal atividade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida do fungo *Aspergillus fumigatus* isolado de amostras do solo da região Amazônica contra *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Verificar a citotoxicidade do filtrado da cultura do fungo *Aspergillus fumigatus* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

Avaliar *in vitro* a atividade anti-inflamatória do filtrado do fungo *Aspergillus fumigatus*.

Avaliar a citotoxicidade do filtrado da cultura do fungo *Aspergillus fumigatus* sobre macrófagos de linhagem Raw 264.7

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram realizados testes *in vitro* utilizando filtrado da cultura do fungo *A. fumigatus*. O filtrado foi estudado em comparação com Glucantime®, fármaco de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose. A pesquisa foi desenvolvida na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico em parceria com Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) que possui como responsável o Dr. João Vicente Braga de Souza e no Laboratório de cultura celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### 4.1 Obtenção do filtrado fúngico

O fungo *A. fumigatus* (LM6020) utilizado no estudo foi cedido pela Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). O bioprocesso foi realizado em Erlenmeyer (150 mL) contendo 50 mL de Caldo de Batata Dextrose (120 g/L de batata, 10 g/L de dextrose).

Nesse meio foi inoculado uma concentração de  $1 \times 10^4$  esporos/mL da espécie de fungo e incubado por 14 dias, sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C. Após esse período, a biomassa foi separada por filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman n.4), o caldo metabólico líquido foi esterilizado por microfiltração a 0,22 µm (Millipore®) e submetido à liofilização. A amostra liofilizada foi armazenada na geladeira à 4°C e foi submetida à determinação da atividade leishmanicida.

Essa etapa já havia sido realizada em pesquisas anteriores e o filtrado utilizado nesta pesquisa já estava liofilizado e armazenado em frasco com peso total de 0,417g.

## 4.2 Manutenção dos Parasitos

Foram utilizadas as cepas de *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), cedidas pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD. Seguindo o protocolo de Jaffe, Grimaldi e Pinero (1984), as espécies utilizadas para o bioensaio foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo (SFBI) e armazenadas em estufa a 25°C.

## 4.3 Curva de crescimento

Para a avaliação do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* sp., foi utilizado o protocolo de Silva (2008) com modificações. Os Parasitos foram cultivado em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI completo na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, incubados à 25°C por 10 dias com volume total de 10 mL.

A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 10ul da amostra, diluída (1:1000) em solução salina e coradas com o corante azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x. Para os estudos, foram utilizadas as formas promastigotas axênicas para determinar a fase logarítmica e estacionária do crescimento. A média aritmética e o desvio padrão foram utilizados para gerar a curva no programa Excel® (Microsoft).

## 4.4 Determinação da atividade leishmanicida e da concentração efetiva 50% (CI<sub>50</sub>) em formas promastigotas de *Leishmania* sp.

A atividade leishmanicida do filtrado de *Aspergillus fumigatus* foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Antes de cada experimento, foi observada a motilidade flagelar e a morfologia dos parasitos com auxílio de microscópio invertido.

Para a realização do bioensaio as formas promastigotas foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos, lavadas em solução salina estéril. Em seguida, a amostra foi diluída e quantificada em câmara de Neubauer, sendo ajustada para obtenção da concentração parasitária de  $1,5 \times 10^6$  células/mL utilizando uma calculadora de diluição celular (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2005)

A amostra liofilizada do fungo *A. fumigatus* foi diluída em 3mL de meio RPMI e filtrado em membrana de Millipore® 0,22µm em ambiente estéril. Os filtrados foram avaliados nas concentrações de 750 µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL e 125 µg/mL. O controle negativo foi constituído de RPMI completo e o controle positivo foi utilizado glucantime® na concentração de 30 µg/mL.

A atividade do filtrado foi avaliada pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. O bioensaio e a contagem dos parasitos foi realizada em triplicata no período de 24, 48 e 72 horas.

Para a contagem dos parasitos, foi retirada de cada tubo uma alíquota de 10µL da amostra, diluída e quantificada em câmara de Neubauer com auxílio do corante azul de Tripán (Cascade Biological™ –USA) em microscópio óptico, aumento de 400 vezes. Foi calculada a porcentagem, média e desvio padrão do número de parasitos vivos e mortos.

## **4.5 ESTUDO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS**

### **4.5.1 Células Raw 264.7**

No experimento *in vitro* foi utilizada a linhagem de macrófago Raw 264.7 de camundongos, cedidas pela Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi da FIOCRUZ-MANAUS.

As células foram mantidas em estufa bacteriológica à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB) e acrescido 50 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Estas células foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas – UFAM.

#### **4.5.2 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico (NO)**

Células de macrófago Raw 264.7 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço em placa de 96 poços. Após o tempo de incubação de 24 h das células a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup>, o meio foi retirado e adicionado meio RPMI suplementado com 10% de SFB com volume final de 100 µL/poço (GREEN et al., 1982).

A seguir as células foram estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e tratadas com o extrato fúngico *A. fumigatus* (LM6020) na concentração de 20 µM/mL.

Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS e fármaco padrão Dexametasona. As células plaqueadas em triplicatas foram incubadas por 24 h a 37°C, 5% de CO<sup>2</sup>, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico (NO).

#### **4.5.3 Quantificação de nitrito (NO<sub>2</sub>)**

A produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada pela dosagem de seu produto de degradação, o nitrito, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo

estável de coloração púrpura para assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50µL/mL do sobrenadante celular de cada poço, incluindo o controle positivo e negativo, foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil) incubados por 15 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório da Cultura de Célula da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas-UFAM.

#### **4.6 Análise Estatística**

Para a determinação da atividade leishmanicida do filtrado fúngico nas formas promastigotas de *Leishmania* sp. foi utilizado o programa Bioestat 5.0™ para estatística descritiva (média e desvio padrão entre réplicas) seguidas de análise de variância pelo teste de ANOVA: 2 critérios para dados paramétricos, sendo adotado o valor de  $p < 0,05$  para diferença significativa entre as médias.

Médias diferentes foram analisadas por meio do teste de Tukey. Para análise de normalidade foi utilizado o teste de Lilifors, com grau de diferença significativa em  $p < 0,05$ . O valor de CI<sub>50</sub> foi obtido através do cálculo de regressão linear utilizando a média de parasitos mortos no programa Excel® 2013.



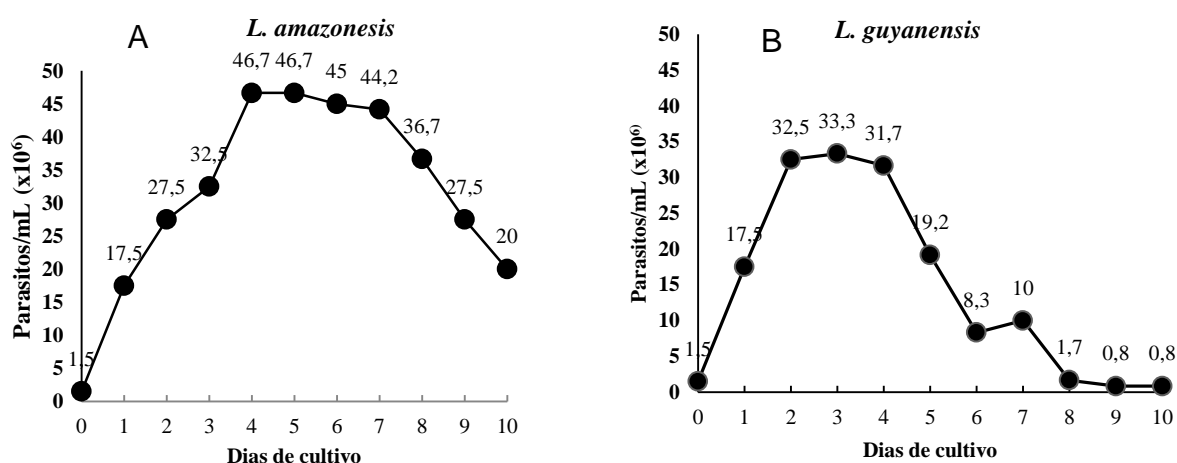
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Curva de crescimento

A análise da curva de crescimento dos parasitos *in vitro* não mostrou similaridade no tempo de crescimento dos parasitos, havendo diferença significativa entre os perfis das curvas. O padrão de crescimento correspondeu ao descrito na literatura, com três fases de crescimento distintas: exponencial/logarítmica, estacionária e estacionária tardia/lag (EVANS, 1989).

Para *L. amazonensis*, a fase exponencial tardia e a fase estacionária ocorreram, respectivamente, no 5º e 6º dia de cultivo. Para *L. guyanensis*, a fase exponencial tardia ocorreu no 3º dia de cultivo e a fase estacionária no 4º (Figura 5 – A e B). As diferenças observadas nas curvas de crescimento, sob as mesmas condições de cultivo, ressaltam diferenças no tempo de replicação celular das duas espécies.

Figura 5. Curva de Crescimento de *L. guyanensis* (A) e *L. amazonensis* (B).



A determinação da curva de crescimento das duas espécies do gênero *Leishmania* deste estudo é fundamental para determinar o estágio e o dia para a utilização dos parasitos no bioensaio. O perfil de crescimento da espécie *L. amazonensis* foi similar aos estudos de Almeida (2012) e Cunha (2017) que utilizaram a cepa PH8 de *L. amazonensis*, mesma cepa desta pesquisa, que demonstrou um aumento expressivo de parasitos na fase logarítmica que vai até o quarto dia.

Em contrapartida, ao analisar os resultados da curva de crescimento de *L. guyanensis* com outras literaturas, verificou-se na pesquisa de Campos (2008) que as promastigotas de *L. guyanensis* apresentaram fase logarítmica de crescimento até o sexto dia. No entanto, um estudo feito por Falcão (2010), mostra que a cepa *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/IM4147) alcançou a fase logarítmica com pico máximo no terceiro dia corroborando com o encontrado em nosso estudo.

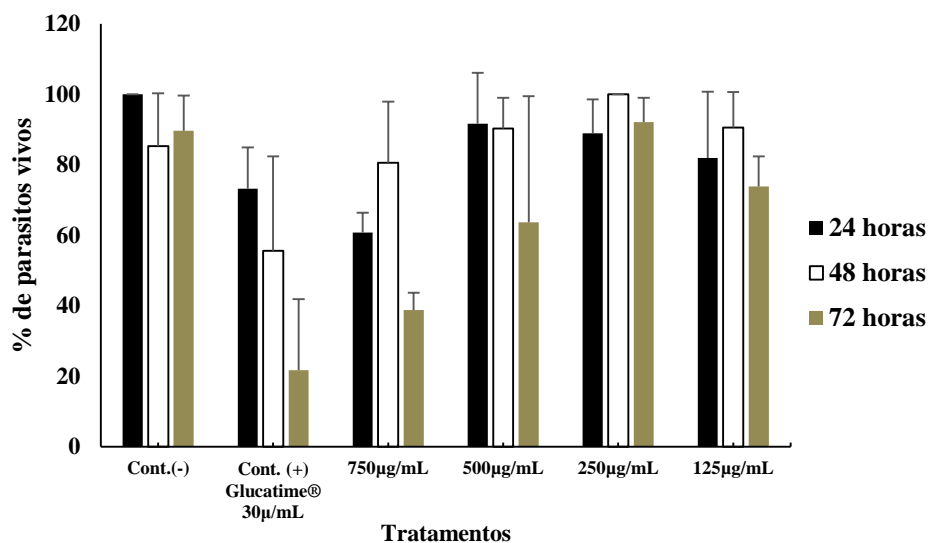
Nota-se que o padrão de diferenciação do parasito na fase de metacicloênese pode variar, dependendo da adaptação do parasito ao meio de cultura, o tipo de meio de cultura, seu pH e sua suplementação, de modo que a fase estacionária do crescimento pode se estabelecer de forma mais rápida ou tardia.

## **5.2 Avaliação da atividade Leishmanicida do fungo *Aspergillus fumigatus* em formas promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis***

A análise do filtrado de *A. fumigatus* mostrou que a porcentagem de promastigotas vivas em *L. guyanensis* na concentração de 750 µg/mL às 72 horas foi de 38,63% aproximada ao percentual obtido pelo Glucantime®, 21,7%.

Em oposição todas as outras concentrações do extrato fúngico apresentaram valores mais próximos ao do controle negativo composto por meio RPMI (Figura 6). O resultado foi corroborado com os testes estatísticos onde a concentração mais alta do filtrado e o Glucantime® apresentaram diferença significativa para com o controle negativo,  $P=0,019$ , teste de ANOVA.

Figura 6. Avaliação do extrato de *A. fumigatus* testado contra *L. guyanensis* no período de 24, 48 e 72 horas.

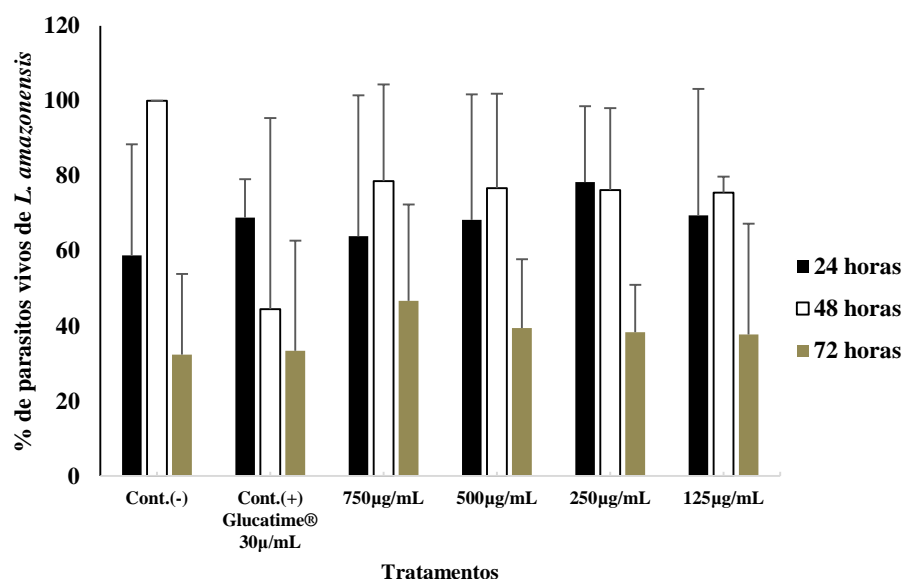


Contudo, para *L. amazonensis* não foi verificado diferença entre a porcentagem de parasitos vivos nas diferentes concentrações do filtrado, em comparação com o controle positivo e o negativo (Figura 7).

O mesmo se comprovou através do teste estatístico realizado com a média do número de indivíduos vivos que não mostrou diferença estatística em nenhuma concentração,  $p=0.9117$ , teste de ANOVA. Isso mostra que o extrato de *A. fumigatus* apresenta atividade leishmanicida distinta de acordo com as duas espécies de *Leishmania* testadas.

Ainda se fazem necessário a repetição dos testes e a extração de substâncias com acetado de etila, por exemplo, para elucidar os resultados e conhecer a substância capaz de inibir a proliferação da espécie *L. guyanensis*.

Figura 7. Avaliação do extrato de *A. fumigatus* testado contra *L. amazonensis* no período de 24, 48 e 72 horas.



Em contrapartida, os valores de  $CI_{50}$  encontrados para o extrato do fungo *A. fumigatus* foi de  $65,46 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$  para *L. guyanensis* e de  $108,5 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$  para *L. amazonensis*, sendo significativo em comparação com os resultados demonstrados anteriormente.

Este é considerado um estudo pioneiro, pois até o momento só foi encontrado na literatura algumas espécies do gênero *Aspergillus* com atividade leishmanicida. Como o estudo feito por Elkhayat *et al.* (2015) utilizando o fungo *Aspergillus terreus* isolado das raízes de *Carthamus lanatus* (Asteraceae), onde compostos butenolídeos, isolado deste fungo, inibiu o crescimento de *Leishmania donovani* com valores de  $CI_{50}$  de 11,24, 15,32 e 27,27  $\mu\text{g/mL}$  e de Silva *et al.* (2017) onde *A. terreus*—F7 apresentou compostos com atividade moderada para *L. amazonensis* ( $CI_{50}$  variou de 23,7 a 78,6  $\mu\text{M}$ ).

Uma pesquisa feita por Mischiatti (2016) com o metabólito DFQ1 (Derivado 1 da 2-fenilquinolina), obtido da biotransformação da 2-fenilquinolina (FQ) pelo fungo *A. fumigatus* demonstrou que esse composto possui atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* em 24 ( $CI_{50} = 5,41 \pm 0,20$ ), 48 ( $CI_{50} = 0,44 \pm 0,18$ ) e 72 horas ( $CI_{50} = 0,24 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ ). Existem, também, estudos do *A. fumigatus* sendo um inibidor significativo de *Mycobacterium tuberculosis*, com concentração inibitória mínima de  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Silva *et al.*, 2018).

Outro estudo, realizado por Rodrigues et al. (2014), utilizando o ácido kójico (KA), um metabólico secundário do gênero *Aspergillus*, demonstrou que esse ácido inibiu 62% (CI<sub>50</sub> 34µg/mL) de promastigotas de *L. amazonensis in vitro*. Verifica-se que os estudos com o fungo do gênero *Aspergillus*, são voltados mais para a espécie de *L. amazonensis*, não sendo encontrado na literatura estudos com a espécie *L. guyanensis*.

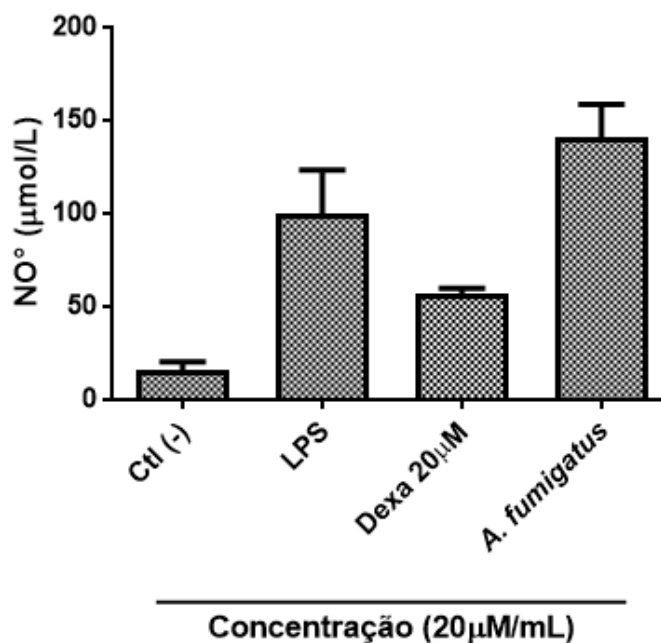
De acordo com Borges, Gomes e Ribeiro-Dias (2018), a espécie *L. guyanensis*, apresenta aspectos únicos e pouco estudados, necessitando de uma melhor caracterização dos parasitos para compreender sua relação com o hospedeiro. Além disso, a presença do RNA vírus tipo 1 (LRV1) em isolados de *L. guyanensis* pode aumentar a gravidade da doença, incluindo a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana – HIV (CALVOPINA, et al. 2017).

Foi constatado a partir deste estudo que o filtrado do fungo *A. fumigatus* apresenta atividade antiparasitária, comprovada estatisticamente, apenas contra *L. guyanensis*. No entanto, precisam de mais estudos principalmente por não ter feito o isolamento da (s) substância (s) que tiveram o potencial de inibir a proliferação dos parasitos de uma espécie que é restrita ao Estado do Amazonas e que ainda existem poucos estudos com relação a este protozoário.

### **5.3 Efeito do extrato de *A. fumigatus* sobre inibição de óxido nítrico (NO°)**

Verificou-se que o extrato do fungo *A. fumigatus* não apresentou inibição de NO, quando comparado ao padrão Dexametasona e ao controle positivo LPS (Figura 8). Sabe-se que o LPS é um lipopolissacarídeo altamente tóxico derivado de membrana celular externa de bactéria Gram-negativa, que se liga a outros receptores como o Toll-like (TLR4) sendo um importante ativador de macrófagos (SILVA, 2016).

Figura 8. Ensaio de inibição do óxido nítrico com *A. fumigatus* em macrófagos Raw 264.7.



A fim de testar os efeitos dos compostos Varicutióis A e B, isolado do fungo *Aspergillus versicolor* LZD-4403 sobre a resposta inflamatória induzida por LPS em macrófagos, Chen et al. (2017) testaram esses compostos em células Raw 264.7 e observaram que esses compostos inibiram a proliferação de células Raw 264.7 induzida por LPS, em associação com a regulação negativa da produção de nitrito e citocinas (MCP-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ).

O ensaio realizado por Du et al. (2018) com extrato EtOAc do *Aspergillus europaeus* WZXY-SX-4-1, mostrou que o composto Benzofenona 9 tem potencial inibitório contra o NF-kB em células SW480 induzida por LPS. Assim como nos de Liu et al. (2018) dois esteroides aditivos natural de Diels-Alder, ergosterdiáceos A e B (1 e 2) extraídos do fungo *Aspergillus* sp. mostraram fortes efeitos anti-inflamatórios *in vitro*, inibindo a produção de NO em 4,5 e 3,6  $\mu$ M, respectivamente.

A partir da análise do gráfico deste experimento, pode-se concluir que o extrato do fungo não tem capacidade anti-inflamatória não sendo capaz de inibir 50% de NO. Assim, não foi realizado o teste de citotoxicidade em macrófagos.

Uma amostra do filtrado foi cedida ao laboratório de Cultura de Células da UFAM que possui com protocolo independente no qual estabelecem que a realização do teste de citotoxicidade com MTT é realizada somente quando a substância ou o filtrado consegue inibir pelo menos 50% de NO. Esse teste é feito somente para observar se a inibição se deu por conta do filtrado ou se ocorreu morte celular.

O óxido nítrico (NO) é liberado em consequência da infiltração celular, induzida pela óxido nítrico sintase (iNOS) e sua quantidade produzida pode determinar se ele vai apresentar efeito protetor ou tóxico (COOKE, 2002; SILVA, 2016).

Desta forma, ficou determinado que o filtrado de *A. fumigatus* é inflamatório para os micrófagos. No entanto, são necessários testes independentes com MTT para comparar se há uma relação da inibição do óxido nítrico com a citotoxicidade do filtrado em macrófagos para que os resultados se tornem mais fidedignos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do teste *in vitro* deste trabalho demonstram que o extrato do fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou inibição satisfatória das formas promastigotas da espécie de *L. guyanensis*, apresentando uma concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) no valor de  $65,46 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ .

No teste inibição do óxido nítrico, o extrato não apresentou capacidade inibitória de 50% em células de macrófagos Raw 264.7. Assim, ficou determinado que o filtrado de *A. fumigatus* é citotóxico para os micrófagos. No entanto, são necessários testes independentes com MTT para comparar se há realmente uma relação da inibição do óxido nítrico com a citotoxicidade do filtrado em macrófagos para que os resultados se tornem mais fidedignos.



## REFERÊNCIAS

1. ABDOSAMADI, Z.; SEYED, N.; RAFATI, S. Mammalian host defense peptides and their implication on combating Leishmania infection. **Revista Elsevier**, v. 309, p. 23-31, 2016.
2. ALMEIDA, G. G. **Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida *in vitro* e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea**. Dissertação (Mestrado em parasitologia)- Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 81p. 2012
3. Amazonas. Fundação de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância das Leishmanioses no Amazonas**. 2017
4. BORGES, A.F.; GOMES, R.S.; RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. **Pathogens and disease**, v.76, n.4. jun,2018.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 190 p. 2017.
6. CALVOPINA, M.; AGUIRRE, C.; CEVALLOS, W.; CASTILLO, A.; ABBASI, I; WARBURG, A. Coinfection of *Leishmania guyanensis* and Human Immunodeficiency Virus–Acquired Immune Deficiency Syndrome: Report of a Case of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Ecuador . **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, fev. 2017.
7. CAMPOS, F.F.; SALES JUNIOR, P. A.; ROMANHA, A. J.; ARAÚJO, M. S.; SIQUEIRA, E.P.; RESENDE, J.M.; ALVES, T. M.; MARTINS-FILHO, O.A.; SANTOS, V.L.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L.; COTA, B. B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p.65-74, 2015.
8. CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* da eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. Dissertação

- (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, 80p. 2008.
9. CARVALHO, C. M. **Estudo dos metabólitos de fungos endofíticos de *Copaifera multijuga* Hayne para uso na terapêutica da tuberculose.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.
  10. CHEN, R.; LIU, D.; GUO, P.; LIN, W. Varicouthiols A and B, new Fungal Metabolites from *Aspergillus versicolor* with Anti- Inflammatory Activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 1, 2017.
  11. CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F. Emergence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* and One Health: time to implement environmental stewardship. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1299–1301, 2018.
  12. COOKE, J. P. Nitric oxide and angiogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 18, p. 2133–2135, 2002
  13. Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009.
  14. CUNHA, B. C. **Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto- Minas Gerais, 83 p. 2017.
  15. DU, X.; LIU, D.; HUANG, J.; ZHANG, C.; PROKSCH, P.; LIN, W. Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities. **Fitoterapia**, v. 130, p.190–197, 2018.
  16. ELKHAYAT, E. S.; IBRAHIM, S. M. R.; MOHAMED, G. A.; ROSS, S. A. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letter**, v. 31, n. 4, p. 1-7, 2015.
  17. FALCÃO, N. M. S. **Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *leishmania (viannia) guyanensis* (kinetoplastida: trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Caesalpinia ferrea* Martius (fabales: caesalpinaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 96p. 2010

18. FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p.224- 230, 2005.
19. GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [N15 nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 26, p. 131-138, 1982.
20. GUERRA, J. A. O.; MACIEL, M. G.; GERRA, M. V. F. TALHARI, A. C.; PRESTES, S. R. FERNANDES, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; MARTINS, A.; COELHO, L. I. A. R. C.; ROMERO, G. A. S.; BARBOSA, M. G. V. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 12-19, 2015.
21. JAFFE C. L.; GRIMALDI, G.; PINERO, D. **The cultivation and cloning of *Leishmania***. A Laboratory Manual. 2ed. Fundação Oswaldo Cruz. 91p, 1984.
22. JENSEN, B. B., COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; GRAFOV, I; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Avaliação da atividade antileishmania in vitro de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p.33-37, 2017.
23. KANSAL, S.; TANDON, R.; DWIVEDI, P.; MISRA, P.; VERMA, P. R. P.; DUBE, A.; MISHRA, P.R. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2650–2660, 2012.
24. KAYE, P. e SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n. 8, p. 604-15, 2011.
25. LIMA, J. R. **Estudo prospectivo de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimônio pentavalente.** *Dissertação ( Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil, 146p. 2017*
26. LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z. J.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.114, n.3,p. 279-287, 2004.

27. LIU, M.; SUN, W.; WANG, J.; HE, Y.; ZHANG, J.; LI, F.; ZHANG, Y. Bioactive secondary metabolites from the marine-associated fungus *Aspergillus terreus*. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 525–530, 2018.
28. LIU, Z.; DONG, Z.; QIU, P.; WANG, Q.; YAN, J.; LU, Y.; SHE, Z. Two new bioactive steroids from a mangrove-derived fungus *Aspergillus* sp. **Steroids**, v. 140, p. 32-38, 2018.
29. MISCHIATTI, K. L. **Biotransformação e avaliação das atividades leishmanicida e anti-inflamatórias de alcaloides quinolíticos e derivados**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil, 158p, 2016
30. MONZOTE, L.; GARCIA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p.6, 2010.
31. OPAS/OMS. **Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Disponível em: <[www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)>. Acessado em 15 de novembro de 2018.
32. OZBILGIN, A.; TOZ, S.; HARMAN, M.; GUNAŞTI, T. S.; UZUN, S.; OKUDAN, F.; GUNGOR, D.; ERAT, A.; ERTABAKLAR, H.; ERTUG, S.; GUNDUZ, C.; CAVUS, İ.; KARAKUS M.; OSTAN URAL, İ.; OLGEM, M. K.; KAYABASI, C.; KURT, O.; OZBEL, Y. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. **Acta Tropica**, v. 190, p. 59-67, 2018.
33. PIMENTA, P. F. P., FREITAS, V. C., SECUNDINO, F. C. **A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores**. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Editora: Copyright: ©, 2012. Cap. 12 (p. 1-45).
34. RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; CARVALHO, A. S. C.; SANTOS, A. S.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus* Fungi, as Antileishmanial Agent. **PLOS ONE**, v. 9, n.3, p. 1-8, 2014.
35. SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W, PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J. KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C.

- Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Stud Mycol**, v. 78, p. 142-173, 2014.
36. SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicas e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Santa Catarina. Florianópolis, 120p, 2008.
37. SILVA, E. M.S.; SILVA, I. R.; OGUSKU, M. M.; MAKI, C. S.; PROCÓPIO, R. E. L. Metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus* and their in vitro effect against the causal agent of tuberculosis. **Acta Amazônica**, v. 48, n. 1, p. 63-69, 2018.
38. SILVA, I. P.; BRISSOW, E.; KELLNER FILHO, L. C.; SENABIO, J. SIQUEIRA, K. A.; VANDRESEN FILHO, S.; DAMASCENO, J. L.; MENDES, S. A.; TAVARES, D. C.; MAGALHÃES, L. G.; SALES JUNIOR, P. A.; JANUÁRIO, A. H.; SOARES, M. A. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus* - F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 3, 2017.
39. SILVA, M. J. A. **Atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da classe dos nitroestirenos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 117p. 2016.
40. SORIANO, B. **Avaliação do potencial antimicrobiano e leishmanicida de materiais orgânicos derivados da base de schiff N, N-Bis' (Salicilideno) – 1,2-Fenilenodiamina**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 56p. 2017.
41. VASCONCELOS, S. A. **Identificação dos vetores da Leishmaniose tegumentar americana em Altos, Estado do Piauí**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz. Teresina, Brasil, 57p. 2017
42. WYREPKOWSHI, C. D. C. **Atividade anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia férrea* e estudos de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas. UFAM, Manaus, 199p. 2015.