

LAYANA AGNES SOUZA DA LUZ

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFITICOS ISOLADOS DE *Aspidosperma excelsum Benth***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho.

Co-orientador: MSc. Josiwander Miranda Carvalho.

Belém - PA

2018
LAYANA AGNES SOUZA DA LUZ

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFITICOS ISOLADOS DE *Aspidosperma excelsum Benth***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho.

Co-orientador: MSc. Josiwander Miranda Carvalho.

Data da Apresentação: 09 de fevereiro de 2018.

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho
Universidade Federal do Pará (FAQUI) – Orientador

MSc. Josiwander Miranda Carvalho
Universidade Federal do Pará (FAQUI) – Co- orientador

Profa. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho
Universidade Federal do Pará (FAQUI) – Membro

Prof. Dr. Heriberto Rodrigues Bitencourt
Universidade Federal do Pará (FAQUI) – Membro

Aos meus pais, Lana e Beto Figueiredo, a minha irmã, Layra, e ao Pedro Tiago, por serem a base de tudo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e Senhor, Jesus Cristo, por me dá capacidade, oportunidade e caminhar comigo diariamente.

Aos meus pais, Lana e Beto Figueiredo, por não medirem esforços, mesmos nas dificuldades, e proporcionar a melhor educação para mim e minha irmã. Por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

A minha irmã, Layra, por ser minha companheira desde que nasceu, em momentos bons e ruins. Será sempre minha maninha.

A todos os meus familiares, meus avôs, tios e primos, por todos os momentos compartilhados, todos os almoços em família, por acreditarem em mim.

Ao meu companheiro e melhor amigo, Pedro Tiago, por toda paciência, carinho, cumplicidade e amor. Por me incentivar e acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava e tornar essa caminhada mais leve. Obrigada pela história que estamos escrevemos juntos.

Ao orientador Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho pela atenção, apoio, paciência e confiança dada para a realização deste trabalho.

Ao co-orientador MSc. Josiwander Miranda Carvalho, pela amizade, atenção, apoio e confiança, por transmitir seus conhecimentos e sempre estar disposto em me ajudar.

A profa. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho pela oportunidade dada em participar do grupo de pesquisa LaBQuiM e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos do laboratório, André, Luana, Luciano, Gisele, Luciana, Arthur, Eduardo e Edson, por todo conhecimento compartilhado e todas as conversas e risadas, principalmente nos dias difíceis. Em especial a Erika e Jeferson, por sempre estarem dispostos a me ajudar, ouvir e por todo apoio.

Aos meus amigos de graduação Pamella, Wilson, Brenda O., Brenda F. e Marillia, pelo incentivo, trocas de conhecimentos e por caminharem junto comigo durante todos esses anos, do nosso jeito chegamos juntos até o fim. Em especial a Érika, minha dupla inseparável e confidente, obrigada por toda paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ou Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ), pelo apoio financeiro.

E a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a concretização deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

O clima tropical na Amazônia brasileira proporciona a proliferação de uma variedade de micro-organismo, entre eles, os fungos endofíticos. A obtenção de micoterápicos dos extratos de fungos endofíticos é uma fonte útil, versátil e renovável de substâncias potencialmente úteis à humanidade, tornando-se de grande importância para combater doenças negligenciadas como a leishmaniose. Leishmanioses são doenças tropicais causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Estas infectam em torno de 12 milhões de pessoas em 80 países do mundo e é estimado que existam 3 milhões de novos casos por ano. Os tratamentos medicamentosos disponíveis para as leishmanioses são à base de remédios antimoniais pentavalentes, como o Pentostan® e Glucantime®, que são tóxicos e nem sempre efetivos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil químico dos extratos de fungos isolados da planta *Aspidosperma excelsum*, espécie do gênero *Aspidosperma* que tem como importante característica a produção de alcaloides indólicos, em sua maioria monoterpênicos, os quais possuem uma variedade de atividades biológicas, dentre elas a atividade leishmanicida. Inicialmente foram isolados 26 fungos da matriz vegetal, após ser analisado o perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência, selecionou-se 6 (com os seguintes códigos, AEC 02, AEC 08, AEC 09, AEC 11, AEC 12, AEC 14) que apresentavam em seus espectros de ultravioleta padrão espectral semelhante ao de alcaloides indólicos. Os ensaios leishmanicida foram realizados *in vitro* com as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo os extratos que apresentaram melhores resultados foram os de código AEC 11 e AEC 12 com $CI_{50} = 6,539 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 3,820 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Palavras-chaves: Fungos endofíticos, atividade leishmanicida, perfil químico, *Aspidosperma excelsum*.

ABSTRACT

The tropical climate in the Brazilian Amazon provides the proliferation of a variety of microorganisms, including endophytic fungi. The acquisition of myco-therapeutics from the extracts of endophytic fungi is a useful, versatile and renewable source of substances potentially useful to mankind, and may be of great importance to combat neglected diseases such as leishmaniasis. Leishmaniasis is a tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. These infect around 12 million people in 80 countries around the world and it is estimated that there are 3 million new cases per year. The drug treatments available for leishmaniasis are based on pentavalent antimonial medicines, such as Pentostan® and Glucantime®, which are toxic and not always effective. Thus, the present work had as objective to evaluate the chemical profile of fungi extracts isolated from the plant *Aspidosperma excelsum*, species of the genus *Aspidosperma* that has as important characteristic production of indole alkaloids, mostly monoterpenes, which have a variety of biological activities, among them leishmanicidal activity. Initially, 26 fungi of the plant matrix were isolated, after analyzing the chemical profile by high performance liquid chromatography, 6 (with the following codes, AEC 02, AEC 08, AEC 09, AEC 11, AEC 12, AEC 14) were selected that presented in their spectra of ultraviolet spectral pattern similar to the one of indole alkaloids. The leishmanicide assays were performed in vitro with the *Leishmania* promastigote forms of Amazons, being the extracts that presented better results with code AEC 11 and AEC 12 with CI-50 = 6.539 µg / mL and CI-50 = 6.539, respectively.

Keywords: Endophilic fungi, leishmanicidal activity, chemical profile, *Aspidosperma excelsum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 –	Distribuição do gênero <i>Aspidosperma</i>	15
Figura 02 –	Espécies arbórea de <i>Aspidosperma</i>	16
Figura 03 –	<i>HPLC-PDA, modelo Waters Alliance®</i>	24
Figura 04 –	Fungos endofíticos isolados da espécie <i>Aspidosperma excelsum</i> e reativados em meio B.D.A.....	25
Figura 05 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 02, λ -254 nm.....	26
Figura 06 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 08, λ -254 nm.....	27
Figura 07 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 09, λ -254 nm.....	27
Figura 08 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 11, λ -254 nm.....	28
Figura 09 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 12, λ -254 nm.....	28
Figura 10 –	Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 14, λ -254 nm.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Percentual de inibição do fungo AEC 02 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	30
Tabela 02 – Percentual de inibição do fungo AEC 08 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	30
Tabela 03 – Percentual de inibição do fungo AEC 09 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	30
Tabela 04 – Percentual de inibição do fungo AEC 11 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	31
Tabela 05 – Percentual de inibição do fungo AEC 12 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	31
Tabela 06 – Percentual de inibição do fungo AEC 14 frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Fungos endofíticos	13
2.1.1 Extratos bioativos de fungos endofíticos.....	13
2.2 Espécie vegetal	15
2.3 Leishmaniose	16
2.4 Alcaloides indólicos	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Materiais, reagentes e instrumentos	22
4.2 Metodologia	23
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Fungos isolados.....	25
5.2 Análise do perfil químico por HPLC-PDA	26
5.3 Ensaio leishmanicida.....	29
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais é uma importante área da Química no Brasil. Há séculos, o homem busca na natureza o alívio e cura para as mais diversas doenças. E o Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO *et al.*, 2002).

Na região amazônica, conhecida por sua grande biodiversidade, possivelmente existe inúmeras espécies de plantas, animais e micro-organismos desconhecidos. Esta variedade de seres vivos presentes na natureza são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos que podem resultar na descoberta de novos fármacos para diversas doenças.

Os micro-organismos (fungos, bactérias, actinomicetos, entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola. Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos ou fungos endófitos, apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas (CHAPLA *et al.*, 2013).

Embora tenham sido descritos a partir do século passado, micro-organismos endofíticos só receberam uma maior atenção há pouco mais de 20 anos, quando foi verificado que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta e podem produzir uma infinidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos), o que representa um mercado de dez bilhões de dólares em todo o mundo (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006).

Nas últimas décadas, aprofundou-se os estudos com endófitos, visto que, a obtenção de extratos de fungos endofíticos é de grande importância para o combate às doenças negligenciadas, pois o rápido ciclo de vida dos fungos e a possibilidade de repiques abrem a possibilidade de obtenção rápida e de grande quantidade de extratos bioativos sem a necessidade de derrubada de várias árvores como ocorre na obtenção dos tradicionais fitoterápicos (CARVALHO, 2014).

Os micro-organismos da espécie vegetal do gênero *Aspidosperma*, pertencente à família Apocynaceae, tem se tornado de grande interesse podendo ser considerada uma das mais importantes fontes de compostos químicos úteis para

a medicina (DI STASI e HIRUMA LIMA, 2002), entre eles, os alcaloides (PEREIRA *et al.*, 2007). A característica marcante das espécies do gênero *Aspidosperma* é a presença de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, e com amplo espectro de atividades biológicas como antitumoral, antimicrobiana, antibacteriana e leishmanicida (HENRIQUE *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2012).

As leishmanioses são um complexo de doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, quase 2 milhões de novos casos de leishmaniose são registrados no mundo, afetando 98 países, dentre os quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, é considerada como uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo e causadas por vinte espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (WHO, 2010). No Brasil foram registrados 21.961 novos casos em 2010, sendo que a maior parte dos casos ocorreu nas regiões Nordeste e Norte (73%). O Estado do Pará registrou 30% dos casos ocorridos na região Norte.

Portanto, esta doença merece atenção no cenário mundial e brasileiro, devido à sua alta incidência e ao risco de causar deformidades com consequente envolvimento psicológico gerando reflexos no campo social e econômico. Além disso, existem inúmeras limitações na quimioterapia, tais como efeitos tóxicos dos fármacos, baixa eficácia dos tratamentos alternativos, alto custo, difícil administração, tempo prolongado do tratamento e resistência parasitária (SILVA, 2016).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo realizar o perfil químico e a atividade leishmanicida dos extratos de fungos endofíticos de *Aspidosperma excelsum*, pretendendo-se contribuir para o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico dos micro-organismos da Amazônia, bem como contribuir para busca de novos fármacos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Um grupo de micro-organismos que tem se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos é o dos endófitos, especialmente os fungos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia. Esses microrganismos têm estimulado o interesse da comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia e farmacêutica (STROBEL, 2003).

O termo endófito originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. São encontradas diferentes definições de endófito na literatura (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010), mas a definida por Bacon e Write amplamente aceita e utilizada, é que endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro (KHARWAR *et al.*, 2011).

Provavelmente todas as plantas possuem micro-organismos endofíticos. Uma mesma planta pode possuir vários deles. Em geral, existem espécies dominantes e secundárias, existindo assim um certo grau de especificidade endófito-hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES e DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993). Em contrapartida, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários à sua sobrevivência, abrigo e transferência às próximas gerações.

2.1.1 EXTRATOS BIOATIVOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

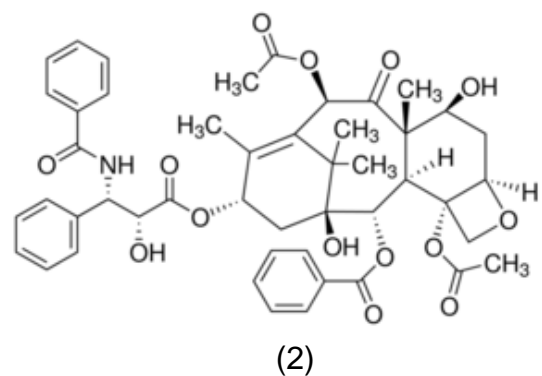
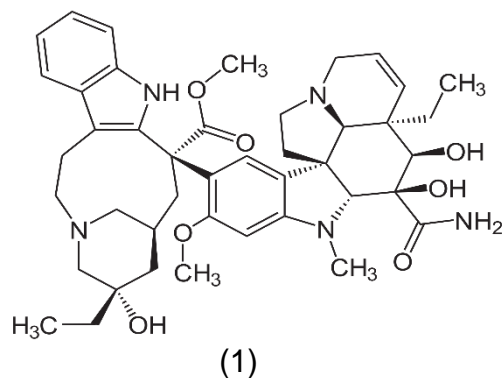
Alguns endófitos podem produzir substâncias químicas características da planta hospedeira. Essa capacidade pode estar relacionada a uma “recombinação genética” do endófito com a planta, que acontece durante o processo de evolução.

Em algum momento durante essa co-evolução, pode ocorrer uma transferência horizontal de genes, o que permite que o receptor execute as mesmas reações biossintéticas do doador. A habilidade do endófito em produzir o mesmo metabólito bioativo que sua planta hospedeira pode reduzir a coleta de plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, preservando-se, assim, a biodiversidade (TAN, 2001; ALY, 2010; STIERLE, 1993).

A produção metabólica depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas. Estes relatos sugerem que a seleção do endófito para estudo, deve ser realizada com espécies vegetais de diferentes biotas, principalmente as que enfrentam frequentes e intensas interações no ambiente como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, entre outras (STROBEL 2003; SCHULZ, 2002).

A variedade de metabólitos secundários produzidos por um único endófito ainda não foi estimada, mas avalia-se que seja alta, devido à versatilidade e facilidade de adaptação dos fungos. Alguns isolados endofíticos possuem a capacidade de produzir diferentes substâncias (AZEVEDO, 2006). Os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como por exemplo, antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, leishmanicida.

Alguns dados da literatura têm reportado a habilidade dos fungos endofíticos em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (STROBEL *et al.*, 1996). Um exemplo bem conhecido foi o isolamento do paclitaxel (taxol®) (1), um potente agente terapêutico antineoplásico, pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta, que também produz esta substância. Outro importante anticancerígeno é a vincristina (2) isolada da planta *Catharanthus roseus*, e também isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (CHAPLA *et al.*, 2013; JALGAONWALA *et al.*, 2011)



2.2 ESPECIE VEGETAL

O gênero *Aspidosperma* Mart. pertence à família Apocynaceae. Esta família possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, de distribuição tropical e subtropical, podendo chegar até regiões temperadas (Figura 01) (JÁCOME & OLIVEIRA, 2004). O gênero *Aspidosperma* Mart., popularmente conhecida como carapanaúba, ocorre desde o México até a Argentina. No Brasil foram identificados aproximadamente 95 gêneros e 850 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008), sendo 32 gêneros encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA, *et al.*, 2007).

Figura 01- Distribuição do gênero *Aspidosperma*



Compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte de 2 a 60 m de altura (WOODSON, 1951; CORRÊA, 1931), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que, as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das Apocynaceae (Figura 02) (VICENTINI e OLIVEIRA, 1999).

Figura 02 – Espécies arbóreas de *Aspidosperma*



Muitas de suas espécies têm grande importância econômica na alimentação, como fornecedoras de madeira ou para fins medicinais (JUDD, *et al.*, 2009). Também possui grande importância na medicina popular, sendo utilizada para tratamento de problemas cardíacos, malária, doenças dermatológicas, como analgésico, vermífugo, abortivo, febrífugo, sedativo, para vômito, cólicas, diabetes, inflamações, câncer, úlceras, gripe, tumores, problemas estomacais, doenças respiratórias, laxante, diarreia, reumatismo, expectorante, luxações, asma, problemas hepáticos, escabiose e como veneno (SANTOS, *et al.*, 2013).

A característica marcante desse gênero é a presença de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, que conferem um amplo espectro de atividades biológicas reconhecidas às espécies desse gênero, tais como antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana, e antibacteriana consistentes e leishmanicida (OLIVEIRA *et al.*, 2009; HENRIQUE *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2012).

2.3 LEISHMANIOSE

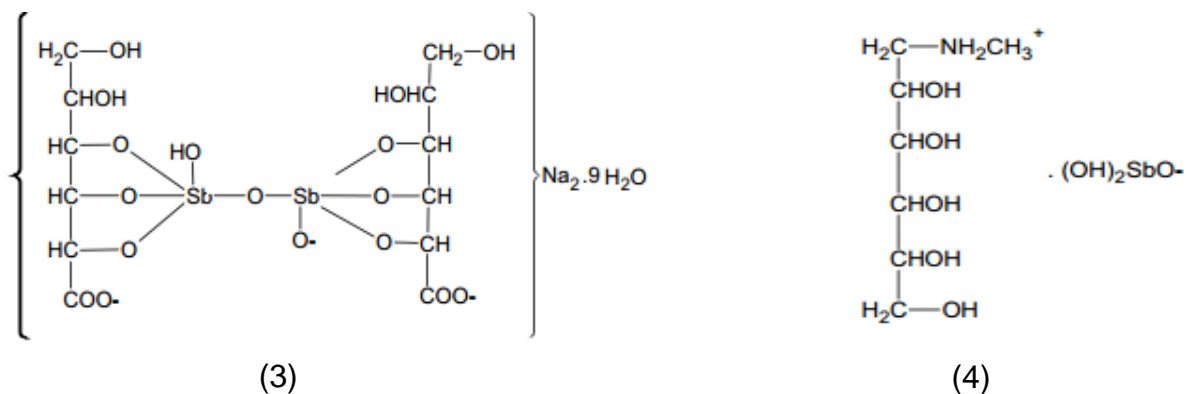
As leishmanioses são um complexo de doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, quase 2 milhões de novos casos de leishmaniose são registrados no mundo, afetando 98 países, dentre os quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, é considerada como uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo e causadas por vinte espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (WHO,2010). No Brasil, em 2014, foram registrados 3.453 casos de leishmaniose visceral, com destaque para a região do

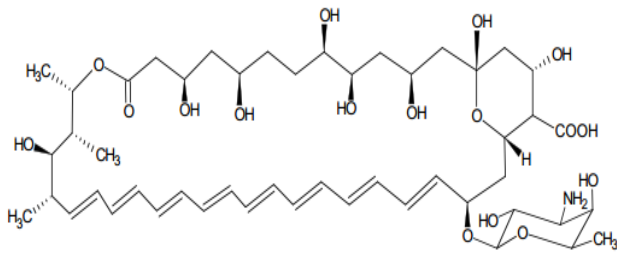
Nordeste. No período de 2010 a 2014 foram registrados somente no Estado do Pará 3.008 casos de leishmaniose visceral (OMS, 2016).

A doença tropical provocada por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo infectar diferentes espécies de mamíferos é transmitida habitualmente para o ser humano através da picada de insetos fêmeas infectadas, pertencentes a espécie *flebotomíneos*. É caracterizada na forma amastigota quando se desenvolve em tecidos de hospedeiros vertebrados e na forma promastigota quando se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (IGLÉSIAS, 1997; REY, 2008; OMS, 2016).

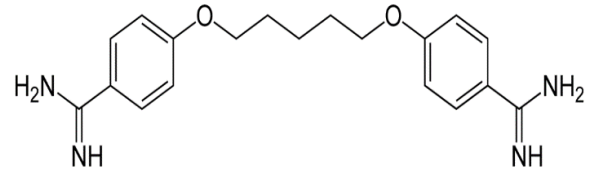
As várias formas de manifestação da doença têm sido usadas pela Organização Mundial de Saúde como base para classificar as leishmanioses em quatro formas: a) visceral, b) cutânea- mucosa, c) cutânea difusa ou disseminada e d) cutânea. No Brasil, as leishmanioses são um sério problema, tendo crescido consideravelmente com o passar dos anos. Os parasitas que mais ocorrem no país são *L. (Leishmania) chagassi* causador da leishmaniose visceral e *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* causadores da leishmaniose cutânea (RABELLO *et al.*, 2010).

Desde a década de 40 a terapia mais aceita para todas as formas de leishmaniose é o uso de antimoniais pentavalentes como o Pentostan® (3) e Glucantime® (4) (ALAVI-ANANI *et al.*, 2012). Entretanto, a presença de diversas formas clínicas da doença e o aparecimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Viannia*, tem dificultado o tratamento (ASHUTOSH *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2007). As drogas de segunda linha como anfotericina B (5) e pentamidina (6) apresentam pouca eficácia devido a presença de cepas resistentes e por serem tratamentos invasivos e tóxicos, causando reações diversas (CROFT & OLLIARO, 2011).





(5)

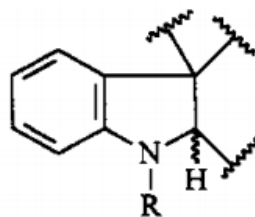


(6)

Por outro lado, as leishmanioses são doenças típicas de países do hemisfério sul, países em desenvolvimento, por isso não há interesse das grandes indústrias farmacêuticas em investir em pesquisas que levem a medicamentos eficazes contra as leishmanioses, devido à população consumidora ser de baixa renda, o que não geraria “lucro” para as indústrias (CARVALHO, 2014).

2.4 ALCALOIDES INDÓLICOS

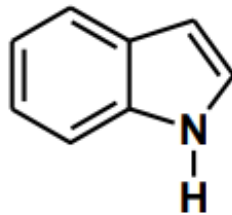
Os alcaloides indólicos tem uma estrutura bicíclica, com anel benzeno fusionado ao anel pirrólico. Este anel contendo átomo de nitrogênio dá ao alcaloide a propriedade de basicidade, fazendo com que sejam ativos farmacologicamente. Esta classe está amplamente distribuída em famílias como Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae e Nyssaceae (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007; SAGI *et al.*, 2016). Em geral os espectros de ultravioleta dos alcaloides indólicos apresentam absorções com máximos próximos a 290 nm, 256 nm e 220 nm, que sugerem a presença do cromóforo indolina (7) (OLIVEIRA, 1999).



(7)

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de estruturas alcalóidicas. No Brasil, se tem a ocorrência do isolamento de mais de 100 alcaloides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcaloides neste gênero (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980).

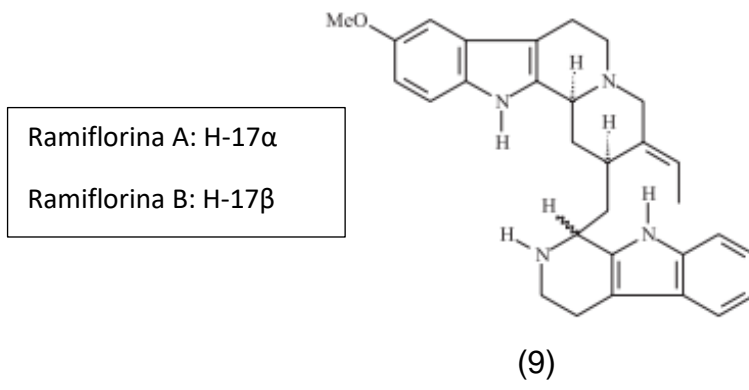
No caso de espécies de *Aspidosperma*, há predominantemente a ocorrência de alcaloides indólicos de considerável diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto β -carbolínico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (8) (ALLEN, 1980). A marcação isotópica de precursores indica que a parte indólica desses alcaloides é derivada biossinteticamente do triptofano e a parte não indólica, provavelmente de carboidratos, pela via chiquimato (WENKERT, 1962). Segundo a literatura, alcaloides indólicos constituem bons marcadores quimiotaxonômicos para classificação botânica das espécies de *Aspidosperma* (GARCIA *et al.*, 1976).



(8)

Biologicamente, muitos alcaloides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (RIVAS *et al.*, 1999; BIEL *et al.*, 1959). Por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (LYON *et al.*, 1973; BENOIT *et al.*, 1973; GARRETT & GRISHAM, 1995). Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia.

Ferreira e colaboradores, em 2004, avaliaram o efeito da atividade leishmanicida do extrato alcaloidal das cascas do caule e substâncias puras de *A. ramiflorum* contra *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis* constatou-se uma maior efetividade contra *L. amazonensis* do que contra a *L. brasiliensis*, tanto para o extrato ($DL_{50} < 47\mu\text{g mL}^{-1}$) quanto para as substâncias puras, ramiflorina A (9) ($DL_{50} = 16,3 \pm 1,6 47\mu\text{g mL}^{-1}$) e ramiflorina B (9) ($DL_{50} = 4,9 \pm 0,9\mu\text{g mL}^{-1}$) (FERREIRA, *et al.*, 2004).



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo realizar o perfil químico de fungos endofíticos isolados da planta *Aspidosperma excelsum*, bem como testar os potenciais leishmanicida de seus extratos. Para isso será preciso realizar as seguintes etapas:

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico
- Cultivar os fungos selecionados para o estudo em pequena escala
- Obter os extratos das biomassas dos fungos selecionados
- Traçar o perfil químico por HPLC - PDA
- Realizar ensaios leishmanicida com os extratos e/ou substâncias isoladas.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS, REAGENTES E INSTRUMENTOS

A. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica – Shimadzu®;
- Evaporador rotativo – Quimis®;
- Capela de fluxo laminar – Pachane®;
- Autoclave vertical 75 L – modelo AV da Phoenix;
- Estufa D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio) – Quimis®;
- Câmara para análise de fluorescência sob luz ultravioleta – Boitton®
- Banho de ultra-som – Unique, modelo USC 1400.

B. SOLVENTES

- Hexano P.A. – Tedia®; Acetato de etila P.A. – Tedia®; Diclorometano P.A. - Tedia®; Metanol P.A. – Tedia®;

C. MEIOS DE CULTURA

- B.D.A. (batata, dextrose e ágar);
- Czapek com 1% de levedura.

D. EQUIPAMENTOS

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): modelo Waters Alliance 2695 acoplado com detector UV (PDA) e coluna Sunfire™ tipo octadecil;

E. PLANTA HOSPEDEIRA

A planta *Aspidosperma excelsum* Benth, foi coletada na Floresta Nacional (Flona) de Caxiuanã compreendida nos municípios de Melgaço e Portel, localizado no nordeste do Pará, com a supervisão da Prof^a Dr^a Maria Fani Dolabela do PPGCF – UFPA (Exsicata nº 206608, depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi.

4.2 METODOLOGIA

A. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A metodologia aplicada para isolamento dos fungos endofíticos foi descrita por PETRINI (1991) com algumas adaptações. O material vegetal, após lavado em água corrente, foi imerso em hexano P.A por 1 minuto para a retirada da gordura existente na superfície. Em seguida mergulhou-se em uma solução de hipoclorito de sódio 2% por 4 minutos e água esterilizada e por fim em álcool 70% por 30 segundos. Nesta primeira etapa busca-se uma eficácia na assepsia e eliminação de micro-organismos epifíticos e contaminantes que possam estar presentes na superfície dos tecidos vegetais.

Posteriormente, o material foi cortado em pequenos fragmentos e inoculados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados em estufa BOD para o crescimento das colônias fúngicas. Os fungos obtidos foram purificados através de repiques sucessivos. Foram isolados 26 fungos.

A preservação dos micro-organismos foi feita em frascos de 10mL contendo água destilada que foram previamente esterilizados em autoclave a temperatura de 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento, fragmentos de cada fungo foi transferido para os frascos, lacrados, identificados e armazenados na micoteca do LaBQuiM (Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos) à temperatura ambiente.

B. CULTIVO E OBTENÇÃO DOS MICRO-EXTRATOS

Os 26 fungos foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA e armazenados em modo estático durante 21 dias para o crescimento das biomassas. Após esse período, pequenos fragmentos de micélio foram transferidos para frascos de 10mL (frascos de penicilina vazios). Conforme descrito por Smedsgaard (1997), com algumas adaptações, em cada frasco, adicionou-se uma a mistura de solventes acetato de etila, diclorometano, metanol 3:2:1. As amostras foram submetidas à extração em banho ultrassônico por 30 minutos, em seguida o material foi filtrado e transferidos para novos frascos e então levados para secagem, obtendo-se assim os microextratos.

C. DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

O perfil químico dos extratos foi obtido através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo modelo Waters Alliance 2695 e detector UV/PDA (Figura 03). Para isso foi pesada uma massa de 1 mg de extrato, dissolvida em 1000 μ L de MeOH e levada para banho de ultra-som. Em seguida, o material foi filtrado com filtros de 0,45 μ m, transferido para vials de 2 mL e analisadas nas condições de gradiente linear de eluição com fase móvel H₂O/MeOH de 10 a 100% por 55 minutos; fluxo de 1,0 mL/min; coluna analítica SunFire™ tipo octadecil silano (C-18), temperatura do forno a 40 °C e λ variando de 210 a 600 nm.

Figura 03 – CLAE-DAD, modelo Waters Alliance®



D. ENSAIOS LEISHMANICIDAS

O ensaio leishmanicida foi realizado *in vitro* com as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/2009/M26361). Os extratos foram adicionados a cultura de promastigotas com 4×10^6 cel/mL nas concentrações de 320 a 0,125 μ g/mL solubilizados em DMSO e incubados, a 25°C, por 24h. Após esse período os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com controles, os quais continham somente DMSO. Anfotericina B (Eurofarma®) foi usado como fármaco de controle. O valor de DL₅₀/24 foi determinado pela análise de regressão linear do percentual de inibição com erro estatístico de 10%.

5 RESULTADOS

5.1 FUNGOS ISOLADOS

No presente trabalho, foram isolados 26 fungos da planta *A. excelsum* (Figura - 04).

Figura 04 - Fungos endofíticos isolados da espécie *Aspidosperma excelsum* e reativados em meio B.D.A.



5.2 ANALISE DO PERFIL QUÍMICO POR HPLC – PDA

Os alcaloides indólicos são caracterizados pela presença do grupo indol, sendo que este grupo pode ser observado pelo espectro de UV que apresenta as bandas de absorção próximas a 290nm, 256nm e 220 nm (OLIVEIRA, 1999). Com base nisso resolveu-se fazer o perfil químico em HPLC/PDA, na busca de substâncias produzidas pelos fungos isolados da planta *A.excelsum* e que possuam o grupo indol. Após a análise do perfil químico destes fungos, foram selecionados os fungos AEC 02, AEC 08, AEC 09, AEC 11, AEC 12 e AEC 14, pois apresentaram em seus cromatogramas (Figura 05 – 10), bandas no espectro de UV com padrão espectral semelhantes ao apresentado por alcaloides indólicos, o que sugere que estes extratos fúngicos possuem compostos que podem apresentar grupos indóis em sua estrutura.

Figura 05 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 02, λ -254 nm.

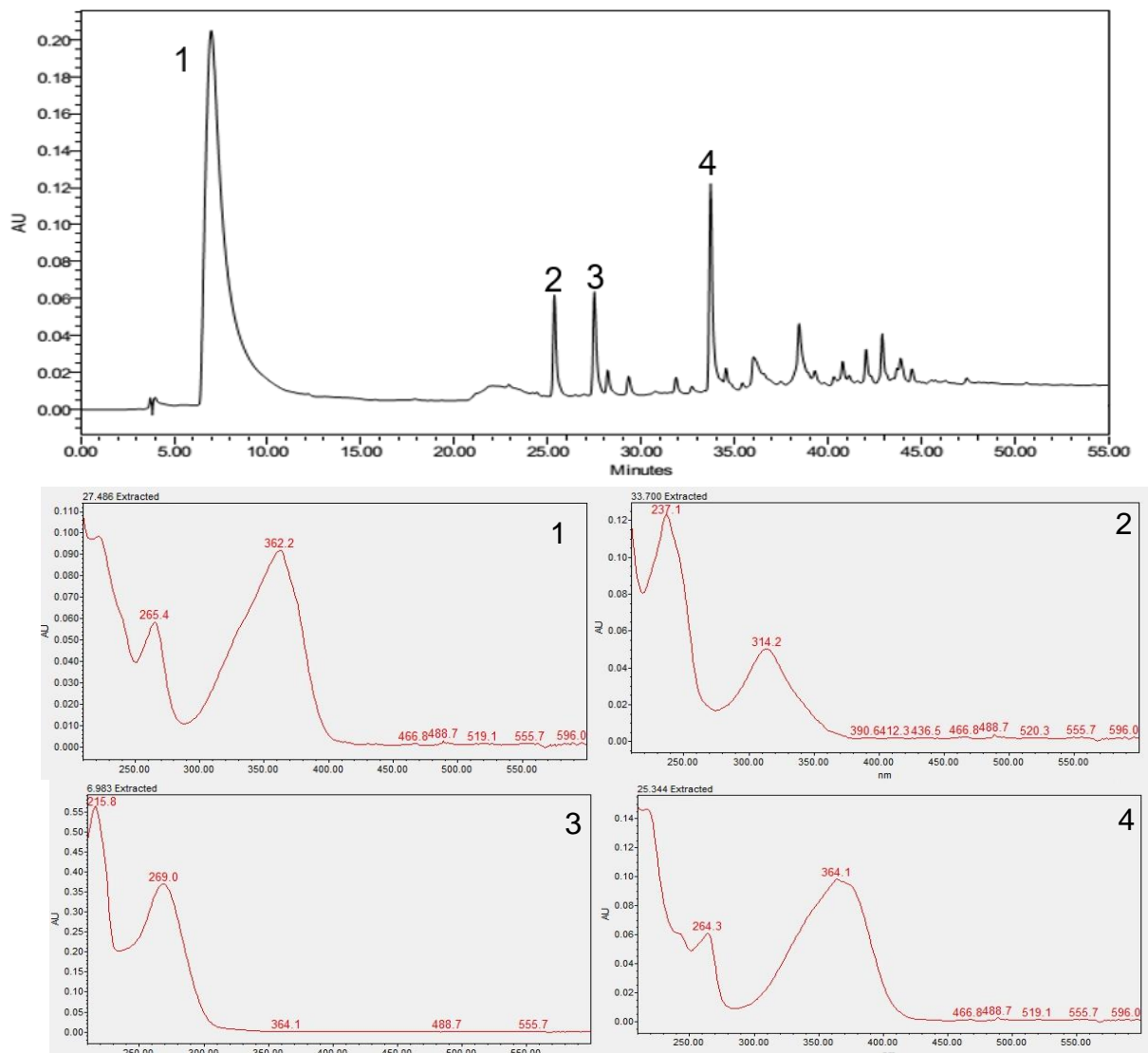


Figura 06 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 08, λ -254 nm.

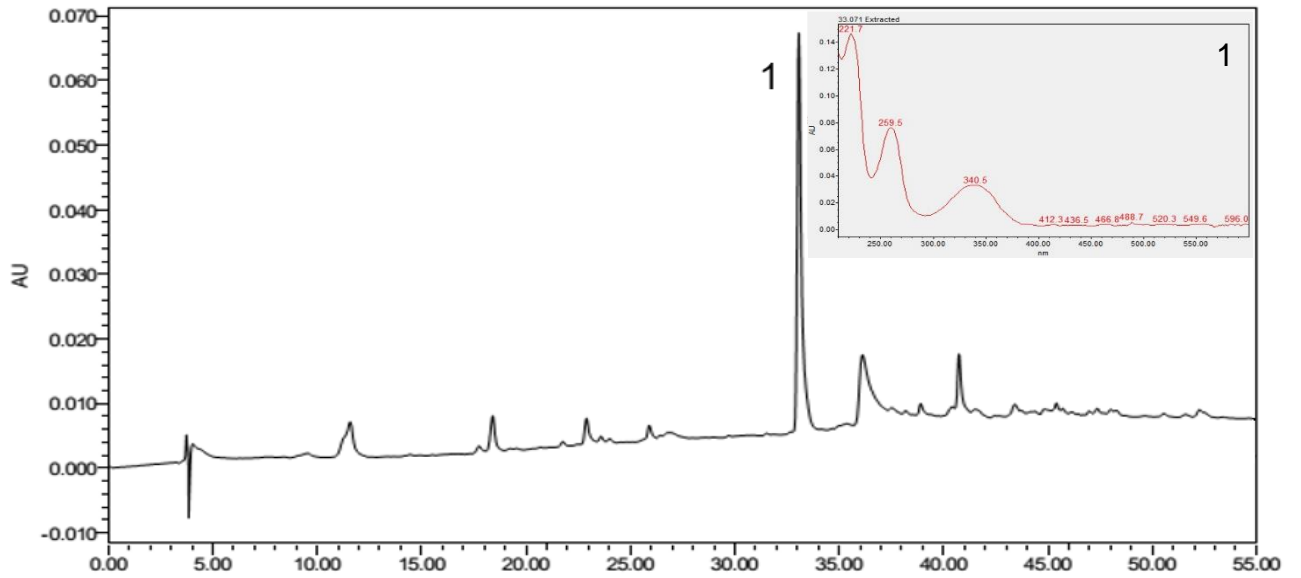


Figura 07 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 09, λ -254 nm.

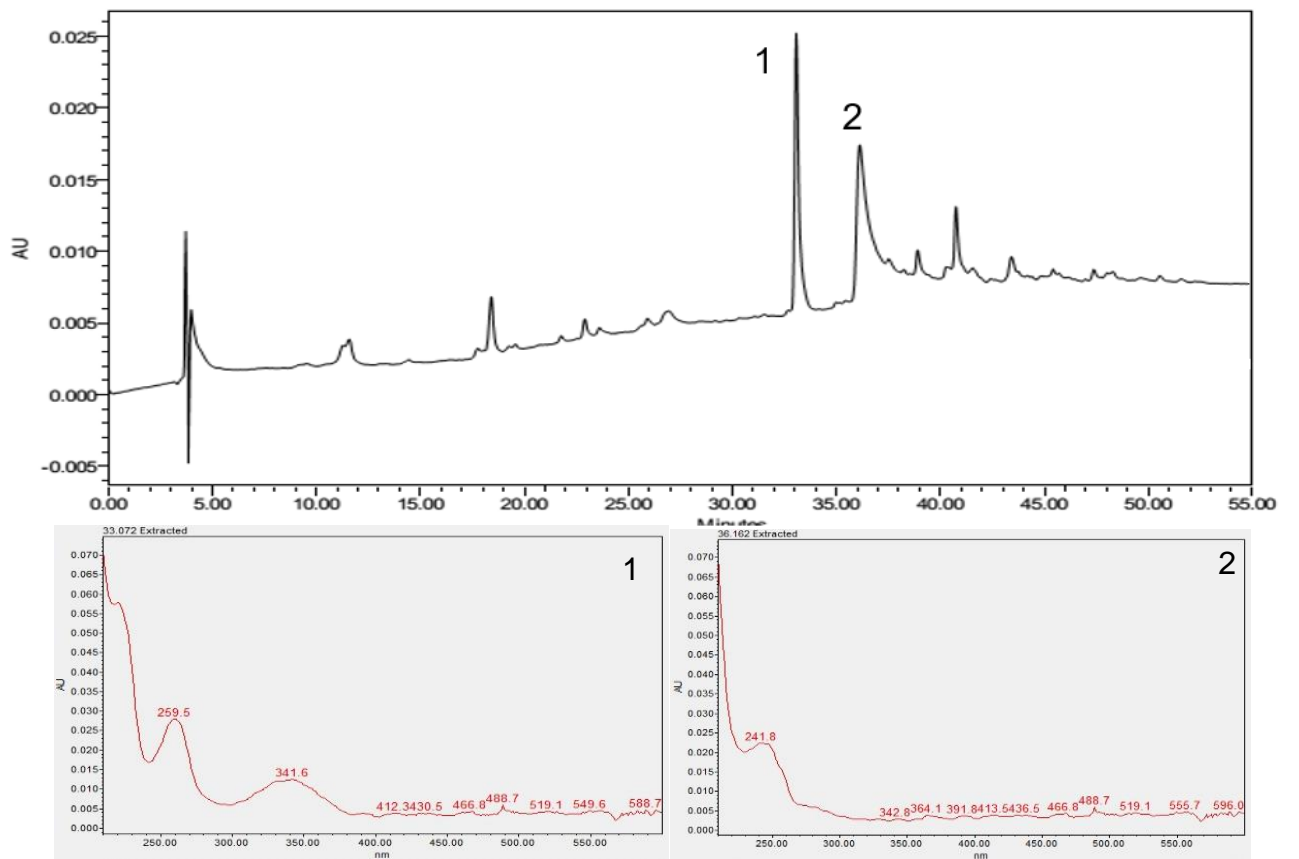


Figura 08 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 11, λ -254 nm.

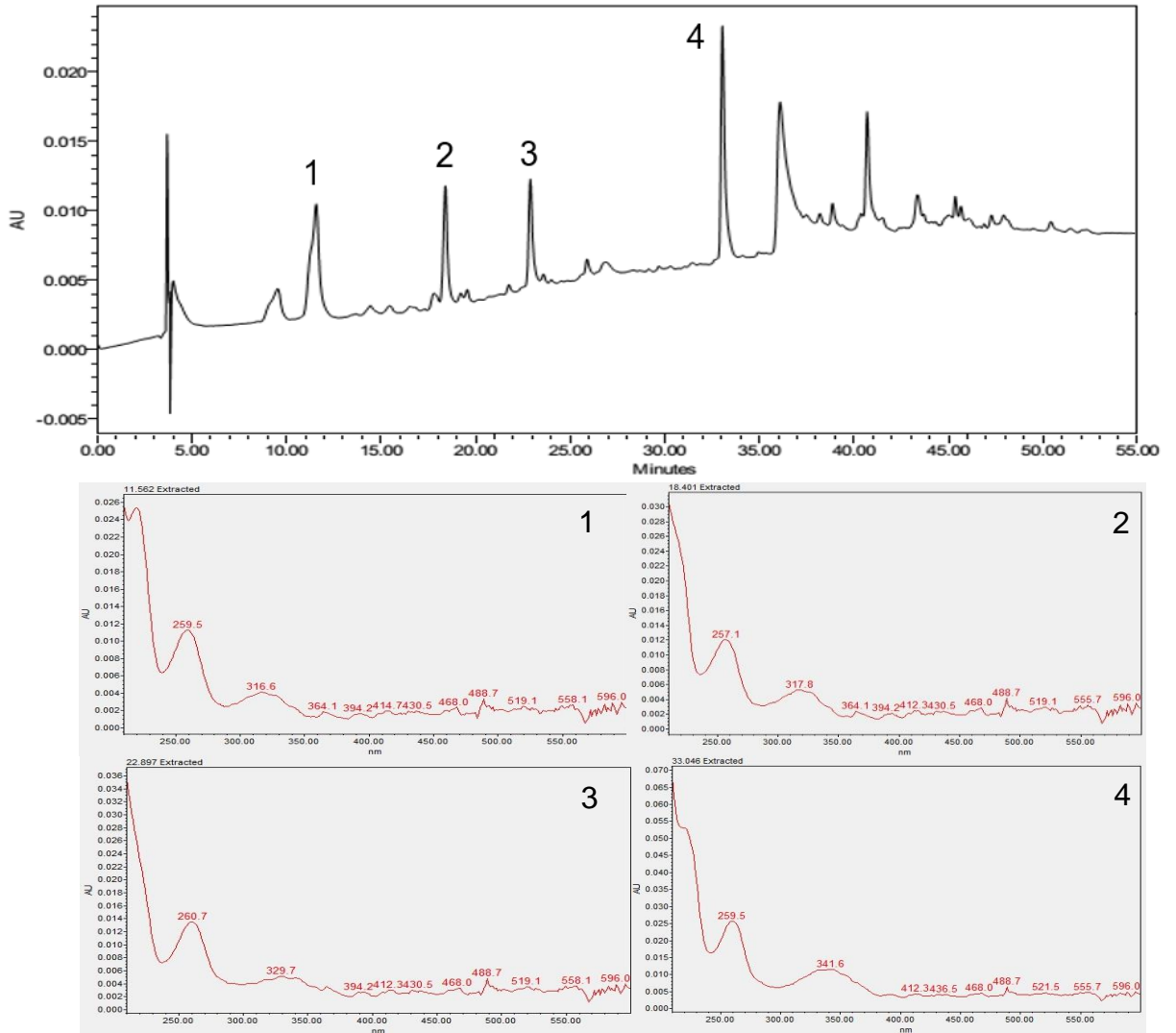
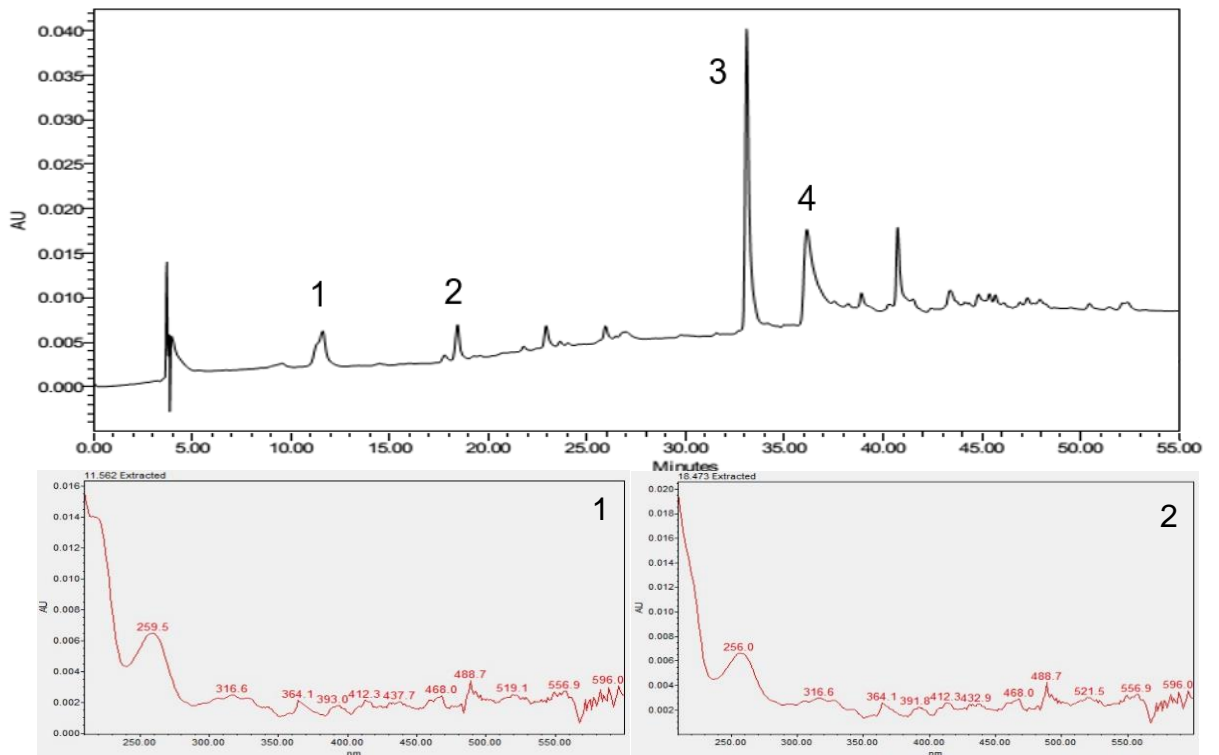


Figura 09 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 12, λ -254 nm.



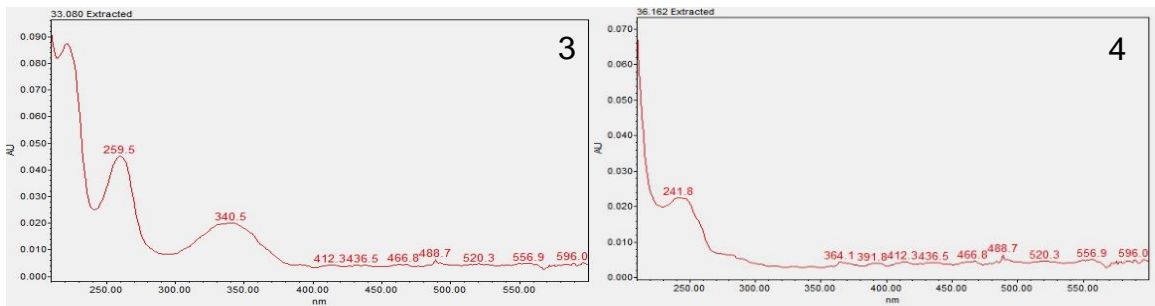
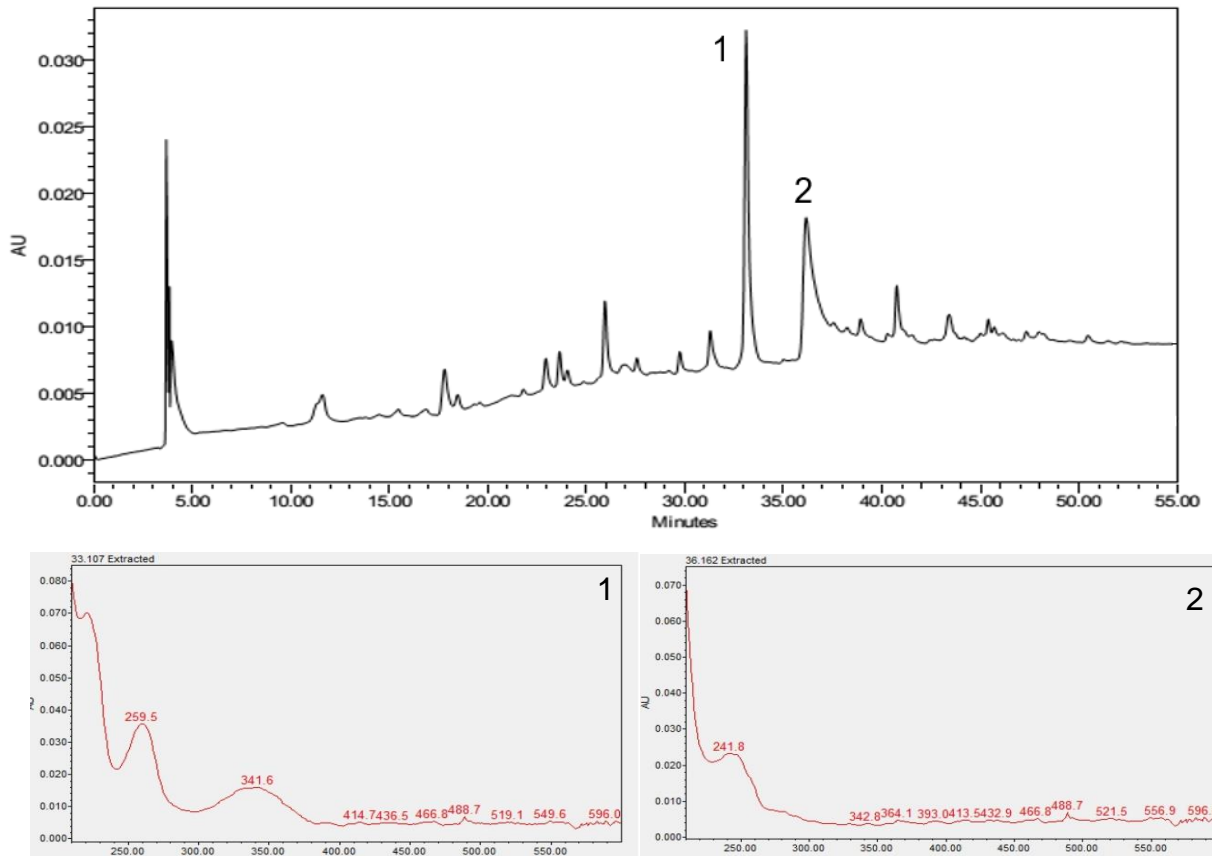


Figura 10 - Perfil químico obtido por HPLC/PDA, extrato AEC 14, λ -254 nm.



5.3 ENSAIO LEISHMANICIDA

Posteriormente, os extratos dos fungos que apresentaram melhores perfis químicos foram submetidos ao ensaio leishmanicida. Os extratos fúngicos com código AEC 02, AEC 08, AEC 09 e AEC 14 apresentaram $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$, mostrando-se assim inativos, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Já os extratos fúngicos de código AEC 11 e AEC 12, apresentaram um $CI_{50} = 6,539 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 3,820 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. As tabelas 1- 6 mostram os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 1- Percentual de inibição do fungo AEC 02 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 02			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,380	0,454	0,437	0,424	0,039	111,111	-11,111
[100 µg/mL]	0,441	0,450	0,433	0,441	0,009	118,143	-18,143
[50 µg/mL]	0,404	0,473	0,386	0,421	0,046	110,050	-10,050
[25 µg/mL]	0,414	0,622	0,410	0,482	0,121	134,328	-34,328
[12,5 µg/mL]	0,454	0,453	0,380	0,429	0,042	113,234	-13,234
[6,25 µg/mL]	0,657	0,500	0,541	0,566	0,081	167,761	-67,761
[3,125 µg/mL]	0,398	0,374	0,517	0,430	0,077	112,499	-13,499

Tabela 2- Percentual de inibição do fungo AEC 08 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 08			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,408	0,416	0,406	0,410	0,039	105,672	-5,672
[100 µg/mL]	0,414	0,416	0,414	0,415	0,009	107,529	-7,529
[50 µg/mL]	0,384	0,432	0,413	0,410	0,046	105,539	-5,539
[25 µg/mL]	0,340	0,368	0,386	0,365	0,121	87,629	12,371
[12,5 µg/mL]	0,362	0,434	0,438	0,411	0,042	106,202	-6,202
[6,25 µg/mL]	0,491	0,318	0,426	0,445	0,081	119,602	-19,602
[3,125 µg/mL]	0,406	0,588	0,444	0,479	0,077	113,267	-33,267

Tabela 3- Percentual de inibição do fungo AEC 09 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 09			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,450	0,645	0,408	0,501	0,126	141,8905	-41,8905
[100 µg/mL]	0,358	0,351	0,363	0,357	0,006	84,70978	15,29022
[50 µg/mL]	0,411	0,463	0,391	0,422	0,037	110,3151	-10,3151
[25 µg/mL]	0,429	0,400	0,435	0,421	0,019	110,1824	-10,1824
[12,5 µg/mL]	0,450	0,499	0,508	0,486	0,031	135,7877	-35,7877
[6,25 µg/mL]	0,599	0,482	0,461	0,514	0,074	147,0647	-47,0647
[3,125 µg/mL]	0,366	0,371	0,547	0,428	0,103	112,8358	-12,8358

Tabela 4- Percentual de inibição do fungo AEC 11 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 11			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,384	0,427	0,400	0,404	0,022	43,672	56,328
[100 µg/mL]	0,368	0,357	0,399	0,375	0,022	28,164	71,836
[50 µg/mL]	0,387	0,368	0,474	0,410	0,057	46,881	53,119
[25 µg/mL]	0,330	0,388	0,405	0,374	0,039	27,986	72,014
[12,5 µg/mL]	0,313	0,380	0,394	0,362	0,043	21,569	78,431
[6,25 µg/mL]	0,332	0,313	0,396	0,347	0,043	13,369	86,631
[3,125 µg/mL]	0,310	0,340	0,359	0,336	0,025	7,665	92,335

Tabela 5- Percentual de inibição do fungo AEC 12 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 12			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,264	0,289	0,302	0,285	0,019	77,734	22,266
[100 µg/mL]	0,294	0,291	0,300	0,295	0,005	83,004	16,996
[50 µg/mL]	0,294	0,312	0,288	0,298	0,012	84,585	15,415
[25 µg/mL]	0,297	0,289	0,288	0,291	0,005	81,072	18,928
[12,5 µg/mL]	0,279	0,295	0,291	0,288	0,008	79,491	20,509
[6,25 µg/mL]	0,264	0,294	0,299	0,286	0,019	78,085	21,915
[3,125 µg/mL]	0,264	0,276	0,237	0,259	0,020	64,032	35,968

Tabela 6- Percentual de inibição do fungo AEC 14 frente à *Leishmania amazonensis*.

	AEC 14			MEDIA	DESCVAP	%VIABILIDADE	%INIBIÇÃO
[200 µg/mL]	0,468	0,484	0,519	0,490	0,026	198,824343	-98,824343
[100 µg/mL]	0,430	0,466	0,422	0,439	0,023	156,500692	-56,500692
[50 µg/mL]	0,434	0,390	0,432	0,419	0,025	139,349931	-39,349931
[25 µg/mL]	0,425	0,391	0,397	0,404	0,018	127,455048	-27,455048
[12,5 µg/mL]	0,396	0,434	0,372	0,401	0,031	124,412172	-24,412172
[6,25 µg/mL]	0,412	0,390	0,387	0,396	0,014	120,816044	-20,816044
[3,125 µg/mL]	0,459	0,336	0,381	0,392	0,062	117,219917	-17,219917

Segundo Nunes (2008), o extrato bruto de *Aspidosperma cuspa*, apresentou-se ativo contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* com $CI_{50} = 47,34 \mu\text{g/mL}$ e $12,94 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Ferreira e colaboradores (2004), avaliaram a eficácia de um extrato de *Aspidosperma ramiflorum* contra a forma promastigotas de *Leishmania amazonensis*, onde observou-se que o extrato alcaloídico apresentou uma $CI_{50} < 47\mu\text{g/mL}$.

Em estudo realizado com extratos de fungos endofíticos, foi observado através da análise de seus perfis químicos, que os mesmos apresentaram em seus espectros de UV, bandas cromatográficas que foram comparados com a literatura (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003) e pode-se verificar que os fungos produziram substâncias das classes dos tricotecenos, dicetopiperazinas, citocalasinas, isocumarinas, alcaloides indólicos, antraquinonas e xantonas (CARVALHO, 2016)

Os extratos estudados apresentaram atividade leishmanicida sobre promastigotas de *L. braziliensis*, sendo que o extrato metanólico de PGVM10, PVVM11 e FEVM23 foram fracamente ativos com $DL_{50} > 320 \mu\text{g/mL}$, já o extrato metanólico de CGVM05 mostrou alta atividade com $DL_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$ (CARVALHO, 2016).

Através dos resultados obtidos do ensaio leishmanicida e após comparação com os dados obtidos da literatura, pode-se afirmar que, os extratos fúngicos AEC 11 e AEC 12 mostraram-se promissores, devido serem altamente ativo em baixas concentrações.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizado o perfil químico via HPLC-PDA de 26 extratos dos fungos isolados *A. excelsum*. Pode-se observar que eles produzem uma gama de metabólitos secundários que podem contribuir para a busca de novos fármacos.

Dos endófitos isolados, seis mostraram-se promissores, devido apresentarem bandas em seus cromatogramas com padrão espectral que sugerem a presença de substâncias que possuem o grupo indol em sua estrutura, grupo conhecido por apresentar dentre outras atividades, a atividade leishmanicida.

Dos fungos testados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, os fungos de código AEC 11 e AEC 12 apresentaram ótimos resultados com $CI_{50} = 6,539 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 3,820 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, o que corrobora com o objetivo deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI-NAINI, R; FAZAELI, A; O'DEMPSEY, T. Tropical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague Medical Report**, v.113, n.2, p. 105-118, 2012.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.; **Phytochemistry**, v.19, p.1573, 1980.

ALY A.H.; DEBBAB A.; KJER J.; PROKSCH P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers** v.41, p.1-16, 2010.

AMORIM, I.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L. Flora e estrutura da vegetação arbustiva-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.3, p.615-23, 2005.

ARAÚJO, W. L. *Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros*. **Dissertação de Mestrado**, ESALQ. Piracicaba, São Paulo, p.111, 1996.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. **Journal of Medical Microbiology**, v.56 (PT 2), p.143-53, 2007.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: I. S. Mello; J. L. Azevedo. (Org.). *Ecologia Microbiana*. 1ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, v.1, p.117-137, 1998.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. *Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants*. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. *Fungi: Multifaceted Microbes*. **New Dehli: Anamaya Publication**, p.189-207, 2006.

BENOIT, P. S.; ANGRY, G.; LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; **J. Pharmacol. Sci.**, v. 62, p. 1889, 1973.

BIEL, J. H.; DRUKKER, A. E.; MITCHELL, T. F.; SPRENGELER, E. P.; NUHER, P. A.; CONWAY, A. C.; HORITA, A.; Central stimulants. Chemistry and structure-activity relationship of aralkyl hydrazines **Journal of the American Chemical Society** v. 81, p. 2805, 1959.

CARVALHO, J. M. Estudo químico dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (CGGVM-05) e avaliação da atividade Leishmanicida e antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos isolados de *Virola michelli*. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2014.

CARVALHO, J. M.; PAIXÃO, L. K. O.; FEITOSA, A. O.; SIQUEIRA, J. E. S.; MARINHO, P. S. B.; DOLABELA, M. F.; MARINHO, A. M. R. Atividade leishmanicida e perfil químico por HPLC-DAD de extratos metanólicos de fungos endofítico de *Virola michelli*. **Sociedade Brasileira de Química**. Goiânia, 2016.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.

COELHO, R.S. Produção do ácido kójico: estudo e otimização de processo e utilização de matérias-primas de baixo custo. **Dissertação**. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

COQUEIRO, A. Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal "Mabeafistulifera Mart." (Euphorbiaceae). **Tese de Doutorado**. Maringá: [s.n.], p.55-60, 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. v.2, p.771, 1931.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. *Leishmania* sischemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n 10, p.399-410, 2006.

CUNHA, A. C.; CHIERRITO, T. P. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P.; SILVA Da, C. C.; TANAKA, J. C.; SOUZA De, L. M.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA DE, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.19, p.413-417, 2012.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gentianales medicinais. In: DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. (Orgs.). **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, p. 375-385, 2002.

DIAS, F.C. et al. *Leishmania donovani* lipo phospho gly candisrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. **Cellular Microbiology**, v.7, n.9, p.1263-70, 2005.

ESPOSITO, E.; Azevedo, J. L.; *Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia*, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010.

FERREIRA, I.C.P. et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.325-327, 2004.

GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S.; **Phytochemistry**, v.15, p. 1093, 1976.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M.; **Biochemistry, Saunders Coll.** Publishing: Orlando, 1995.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Quim. Nova**, v.33, n.2, p.284-287, 2010.

IGLÉSIAS, J. D. F. Aspectos médicos das parasitoses humanas. Editora Medsi: Rio de Janeiro, p. 41-65, 1997.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; Estudo Químico e Perfil Cromatográfico das Cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau-Pereira"). **Química Nova**, v. 27, p.897-900, 2004.

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. *J. Microbial Biotechnology. Res.* v. 1, 21, 2011

KHARWAR, R. N.; Mishra, A.; Gond, S. K.; Stierle, A.; Stierle, D. *Nat. Prod. Rep.* **2011**.

LI, C.; YAN, H.; GAO, S.; WANG, B. Chemical constituents of a marine-derived endophytic fungus *Penicillium commune* G2M. **Molecules**, v.15, p.3270-3275, 2010.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H.; J. **Pharm. Sci.** v. 62, p.218, 1973.

NUNES, R. K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Centro de Ciências Biológicas - CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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 Brazilian Chemistry Society**, v.16, n.2, p.280-283, 2005.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E. Dicitrinol, a Citrinin Dimer, Produced by *Penicillium janthinellum*. **Helvetica Chimica Acta**, v.94, n.5, p.835-841, 2011.

MISHRA, B.B.; KALE, R.R.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

OLIVEIRA, A. J. B. Estudo de seis espécies do gênero *Aspidosperma* utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise Quantitativa e Qualitativa. Teste bioautográfico; Cultura de tecidos e células vegetais e rota de preparação dos compostos diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 1999.

OMS, 2016. Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis. Fact sheet nº 375.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993

PERREIRA, M. M.; JÂCOME, R. L. R. P.; ALCANTARA, A. S. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.970-983, 2007.

PINTO, A. C; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

RABELLO, A.; ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.420-430, 2010.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 4ª ed., p. 359-410, 2008.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; **Biochem. Phys.**, Part C, n. 122, 27, 1999.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesq. Agropec. Bras**, v.31, n.12, p.905-909.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n. 3, p. 442- 458, 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; BRAEGER, S.; ROMMERT, A.; KROHN, K. **Mycol. Res.** v. 106, p.996, 2002.

SEM, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. **Phytomedicine: International journal of Phytopharmacology**, v.18, n.12, p.1056-69, 2011.

SILVA, J. V. S. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmaniana de espécies *Geissospermum* (Apocunaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências da Saúde, Belém-PA, 2016.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure of standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v.760, p. 264-270, 1997.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia de ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 704, 2008.

STIERLE A.A.; STROBEL G.A.; STIERLE D.B. Investigation of fungi associated with the pacific yew tree *taxus-brevifolia*. **Abstract of Papers** - American Chemical Society v. 205, n.8, 1993.

STROBEL G. A.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Mol Bio Rev** v.67, p.491-502, 2003.

TAN R.X.; ZOU W.X. Endophytes; a rich source of functional metabolites. **Natural Product Report** v. 18, p.448-59, 2001

VICENTINI, A.; OLIVEIRA, A.A. Apocynaceae e Asclepiadaceae. **Flora da reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA – DFID, v.2, p.568-81, 1999.

WENKERT, E.; J. AM. **Chem. Soc.**, n.84, 98, 1962.

WHO EXPERT COMMITTEE. Control of the leishmaniasis. WHO technical report series; no. 949. **Reporto of a meeting of the WHO Expert Committee on the Contro of Leishmaniasis**, geneva, p.22-26, 2010.

WOODSON, R.J. Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.38, p.119- 204, 1951.